

Liana Marengo de Medeiros<sup>1</sup>; Fernanda Lopes<sup>1</sup>; Giovana Londero<sup>1</sup>; Leonardo Lisbôa Motta<sup>1</sup>; Guilherme Antônio Behr<sup>1</sup>; Valeska Aguiar Oliveira<sup>1</sup>; Lisiane Porciúncula<sup>1</sup>; José Claudio Fonseca Moreira<sup>1</sup>; João Batista Teixeira da Rocha<sup>2</sup>; Fábio Klamt<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS  
<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria, RS.

## Introdução

Os mecanismos moleculares que levam ao dano da via nigroestriatal durante a progressão da Doença de Parkinson (DP) ainda não estão totalmente elucidados. Parte desta dificuldade ocorre pela falta de um modelo experimental adequado para o estudo, já que o cultivo primário de neurônios dopaminérgicos apresentam baixo rendimento (menos de 15% de células TH-positivas). Previamente nosso grupo estabeleceu as melhores condições experimentais para a diferenciação do neuroblastoma humano SH-SY5Y em neurônios dopaminérgicos. Dessa forma, devido a escassez de modelos experimentais que representem de forma mais acurada a fisiologia e a bioquímica de um neurônio dopaminérgico, o objetivo deste estudo foi estabelecer parâmetros de avaliação neurotóxicos/neuroprotetores de diferentes compostos utilizando-se a linhagem diferenciada do neuroblastoma humano SH-SY5Y.

## Materiais e Métodos

As células SH-SY5Y foram cultivadas em meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino+(SFB). A diferenciação foi induzida com 10µM de ácido retinóico em meio de cultura com 1% de SFB por sete dias.

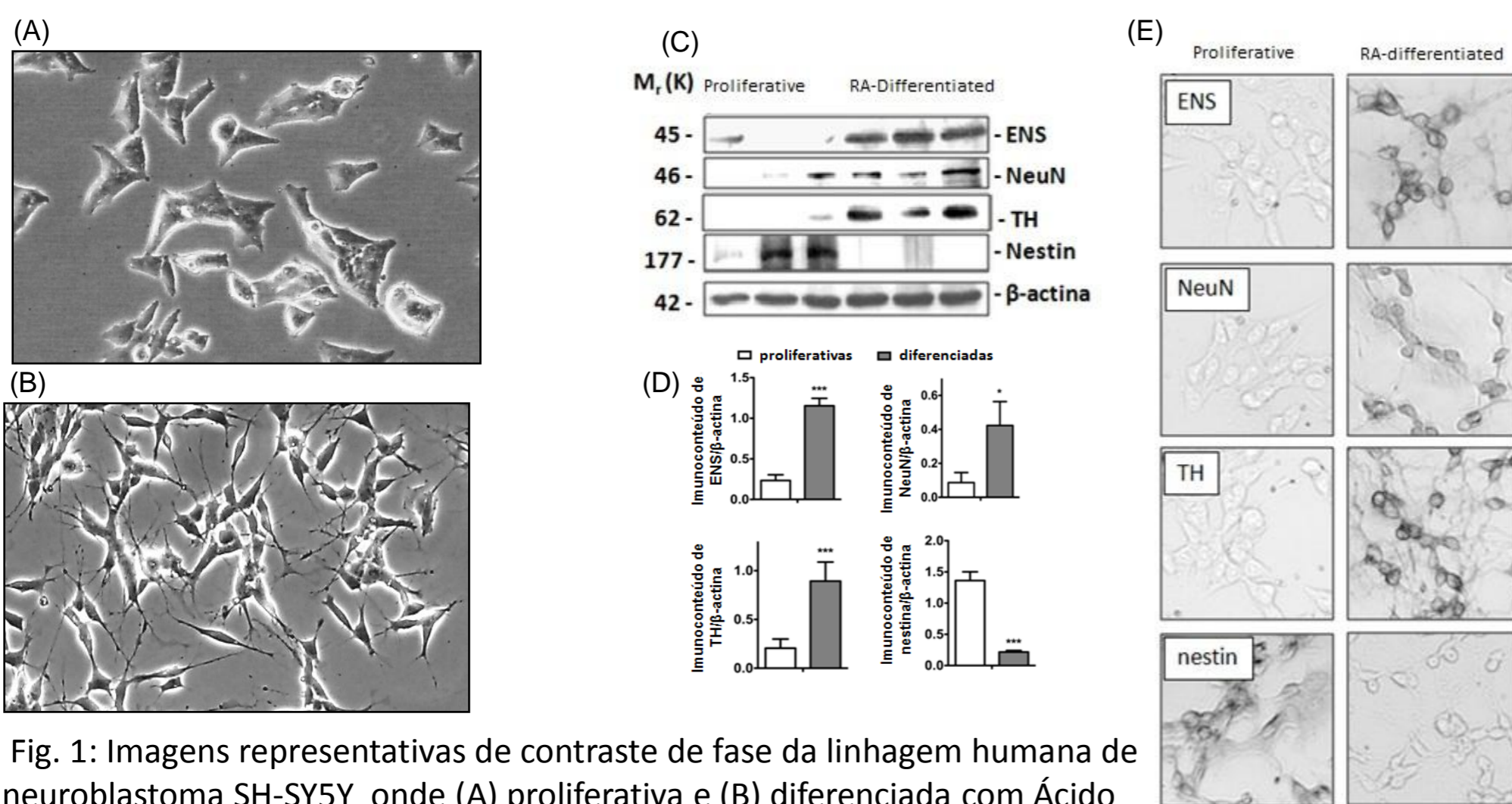


Fig. 1: Imagens representativas de contraste de fase da linhagem humana de neuroblastoma SH-SY5Y onde (A) proliferativa e (B) diferenciada com Ácido Retinóico (400X). (C) Western blot mostrando o imunocônteu de marcadores de diferenciação neuronal e do marcador de célula indiferenciada. (D) Análise de densitometria das bandas representada por média DP de três experimentos independentes.

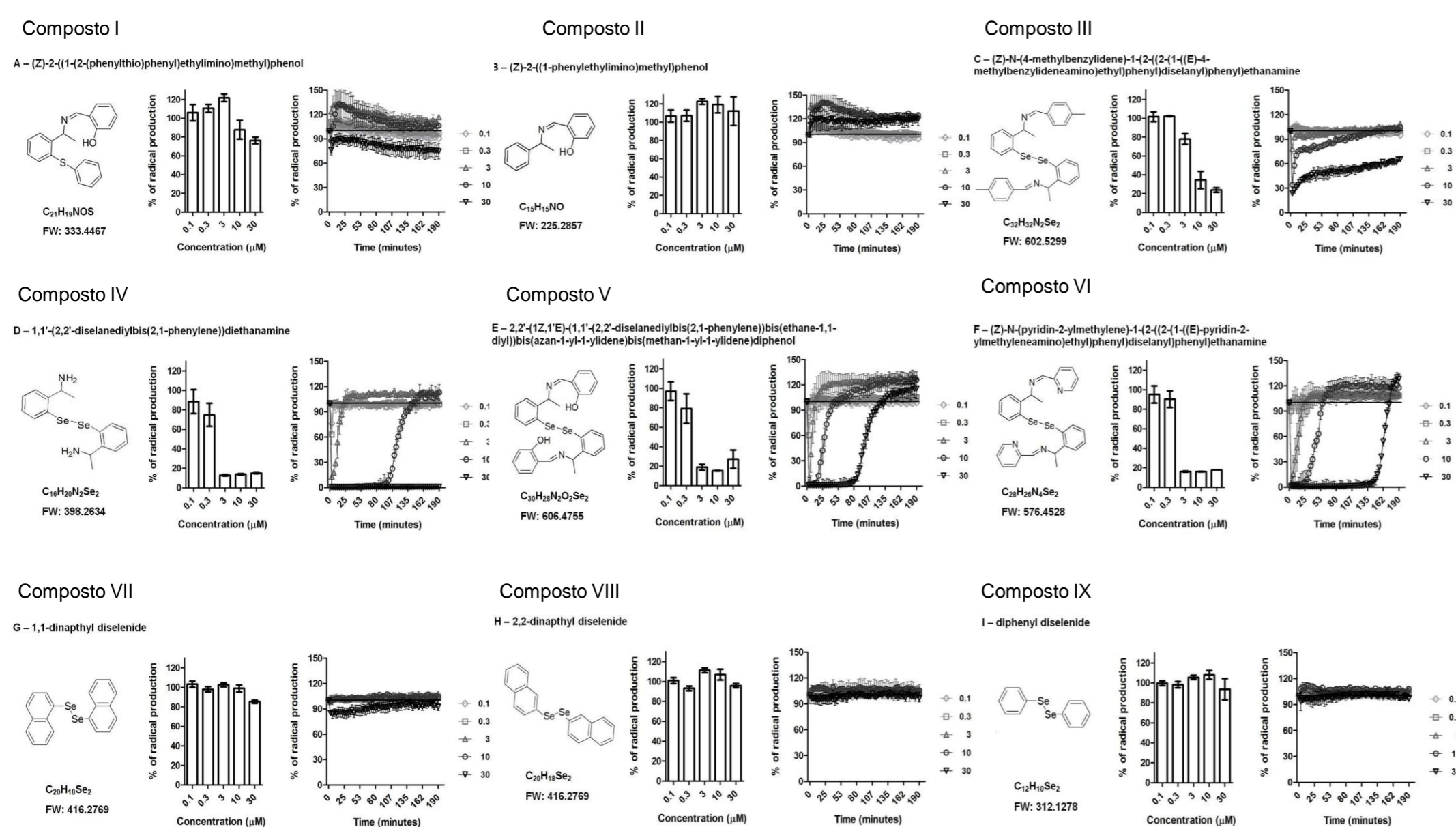


Fig. 2: Estrutura molecular de nove organocalcogênios e sua nomenclatura. Capacidade antioxidante total determinada pelo método de TRAP *in vitro* dos nove compostos nas concentrações de 0.1, 0.3, 3, 10 e 30µM.

Como parâmetros neurotóxicos/neuroprotetores foram estabelecidos os ensaios de viabilidade celular pelo método do MTT, capacidade antioxidante pelo método do TRAP, determinação do número de neuritos presentes nas células, e ensaio de neuroproteção frente ao insulto da 6-OHDA.

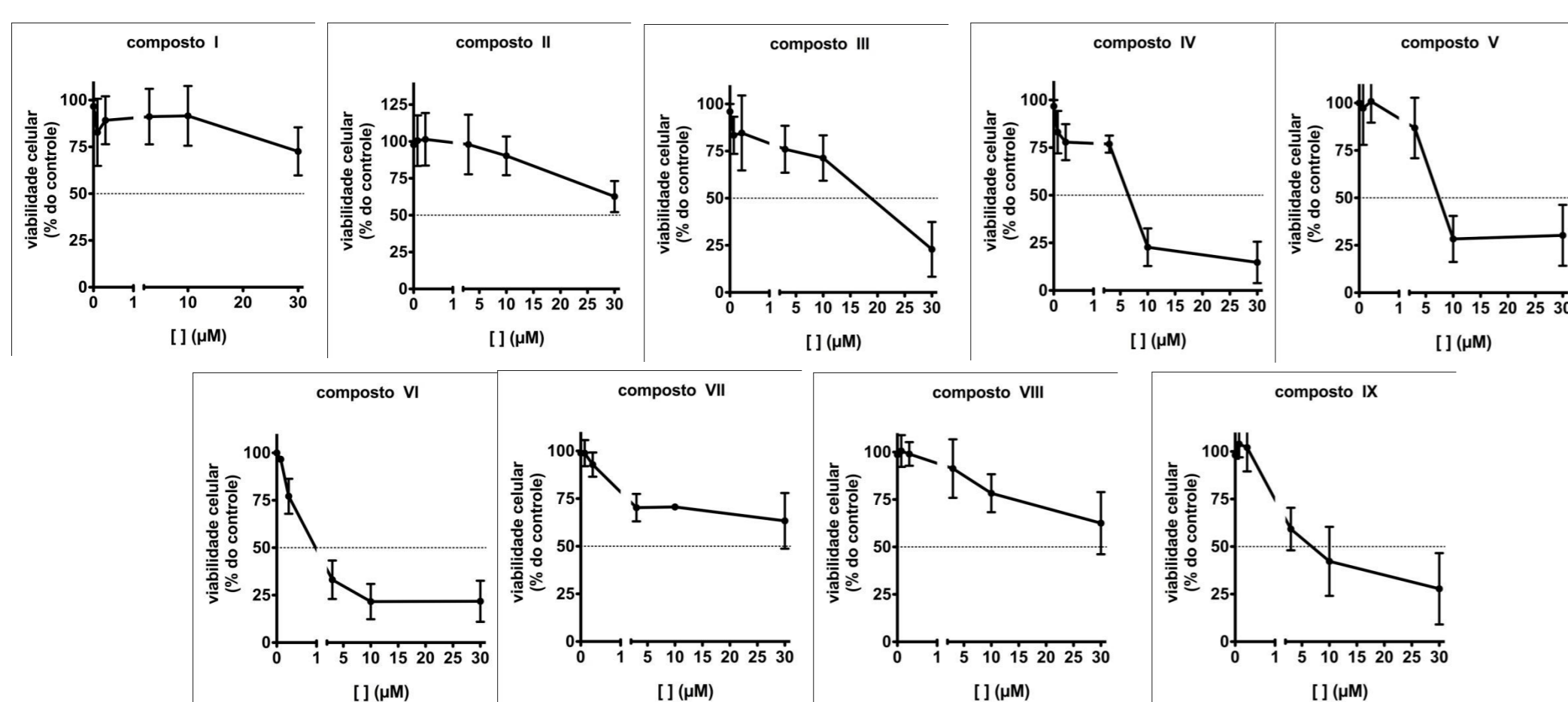


Fig. 3: Curvas de viabilidade celular para cada um dos organocalcogênios. Células foram tratadas por 24hs e a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT.

Como parâmetros neurotóxicos/neuroprotetores, foram estabelecidos os ensaios de viabilidade celular pelo método do MTT, capacidade antioxidante pelo método do TRAP, determinação do número de neuritos presentes nas células, e ensaio de neuroproteção frente ao insulto da 6-OHDA.

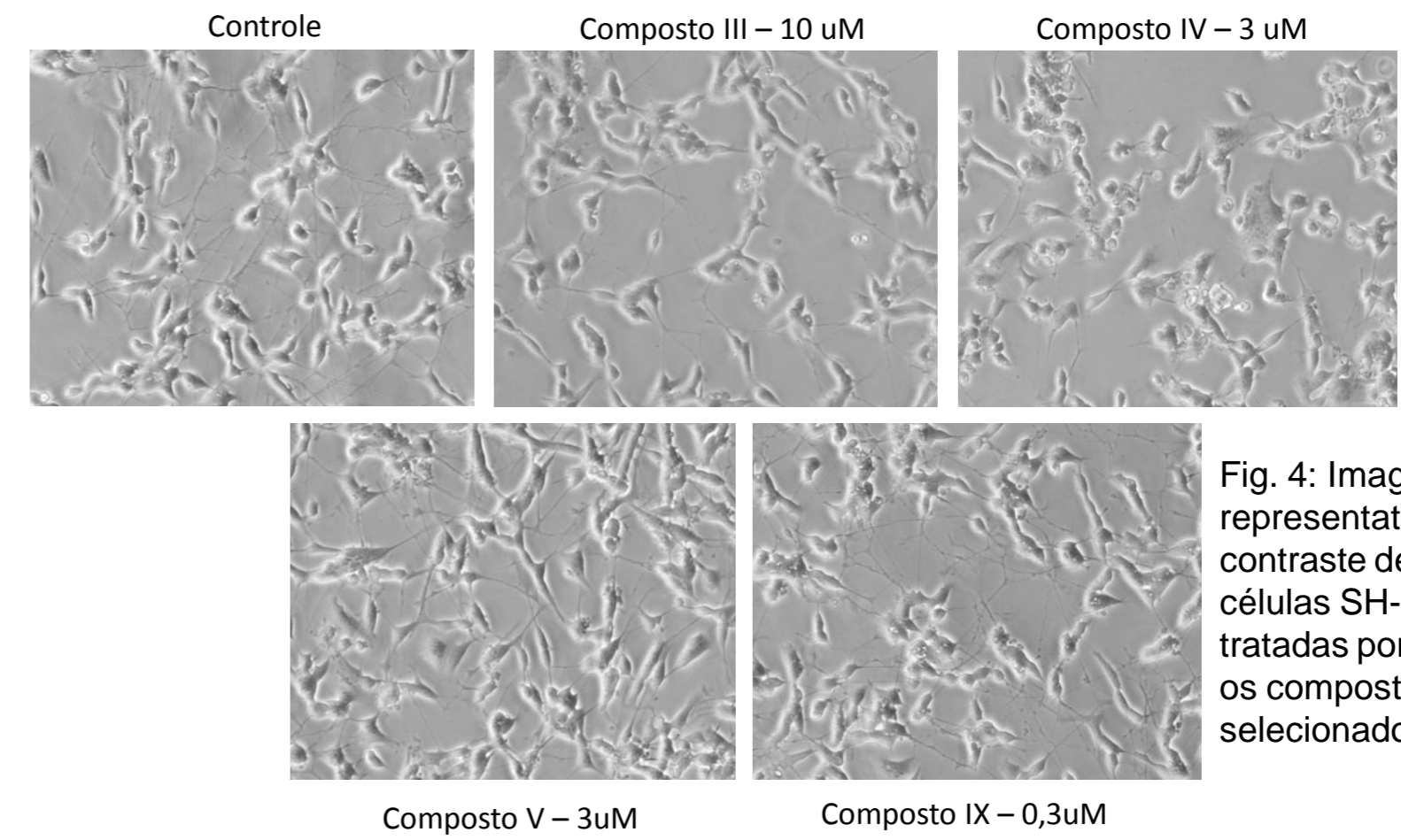


Fig. 4: Imagens representativas de contraste de fase das células SH-SY5Y tratadas por 24hs com os compostos selecionados.

A partir desses ensaios, nós avaliamos o potencial neurotóxico/neuroprotetor de nove organocalcogênios. Os compostos que apresentaram alta capacidade antioxidante e baixa citotoxicidade foram selecionados para o ensaio de neuroproteção frente a 6-OHDA. As células foram tratadas com os compostos por 24hs, lavadas e depois incubadas com a neurotoxina.

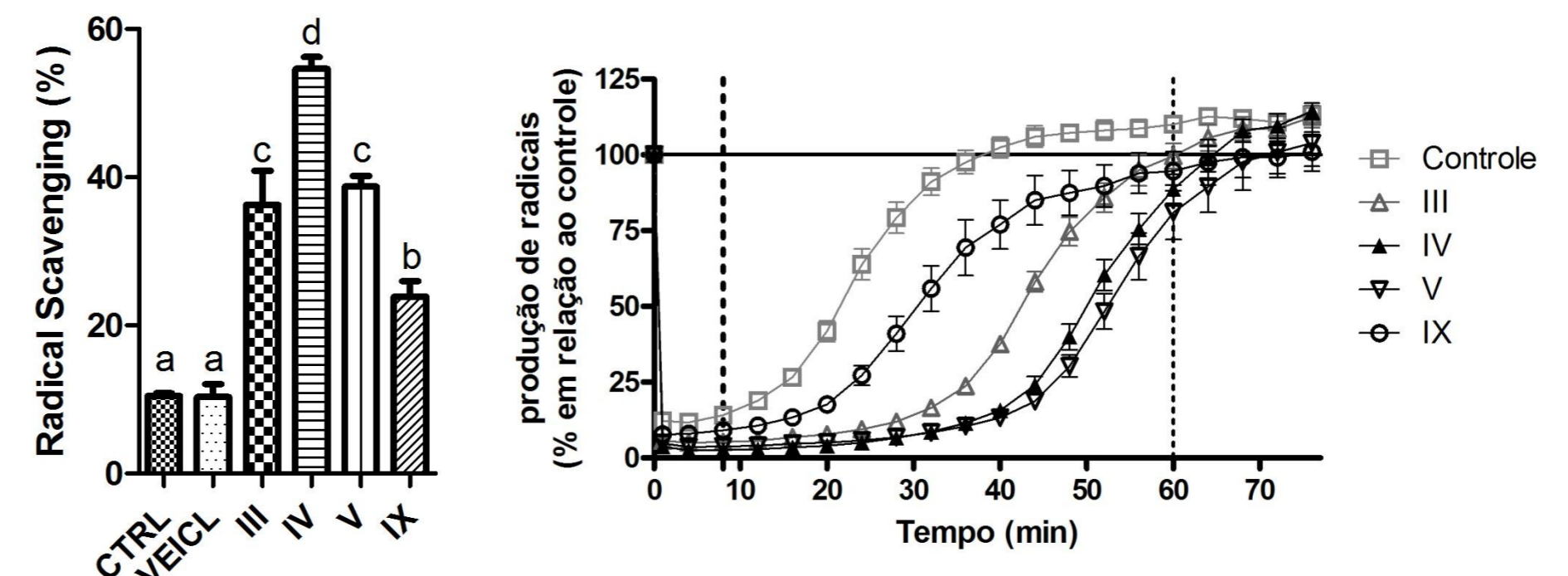


Fig. 5: Capacidade antioxidante total determinada pelo método de TRAP das células diferenciadas tratadas (24HS) com os quatro compostos selecionados nas concentrações de 0.1, 0.3, 3, 10 e 30µM.

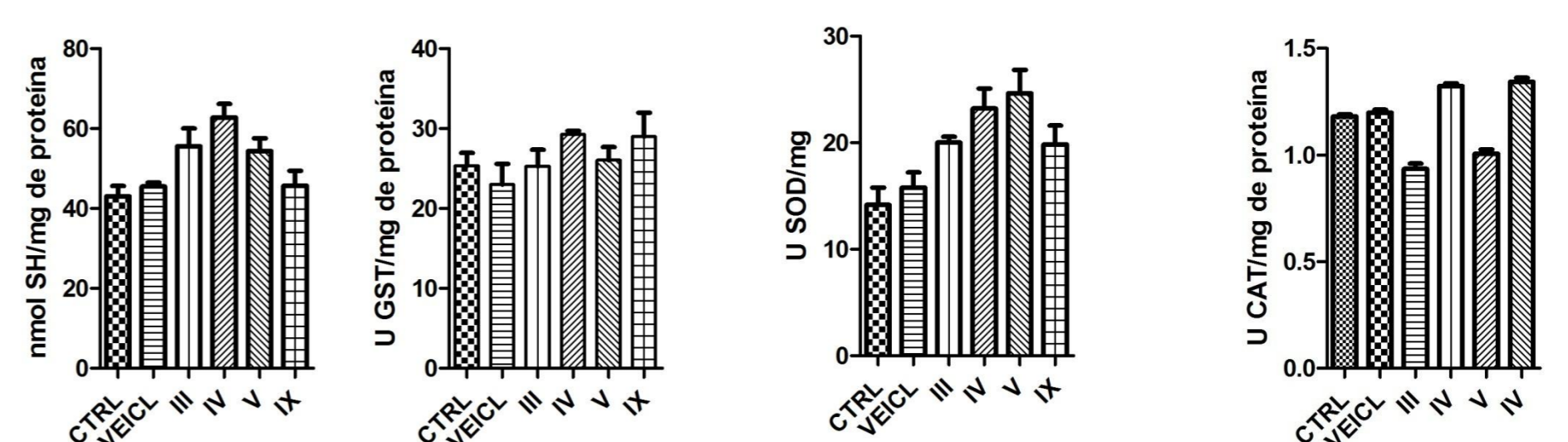


Fig. 6: Níveis de grupos sulfidrilas (-SH) foram medidos. 10 mM de DTNB foi adicionado e lido a 412nm depois de 60 min. Atividade da Glutationa-S Transferase (GST) foi determinada medindo-se a formação do conjugado SH e CDBN. Atividade de Superóxido Dismutase (SOD) foi medida pelo ensaio de auto-oxidação da adrenalina a 480nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de amostra que inibe 50% da oxidação da adrenalina. E Catalase foi determinada pelo método baseado no decaimento da quantidade de peróxido de hidrogênio devido à reação catalisada pela própria enzima. Todas atividades enzimáticas estão expressas como Unidades de enzima/ mg de proteína.

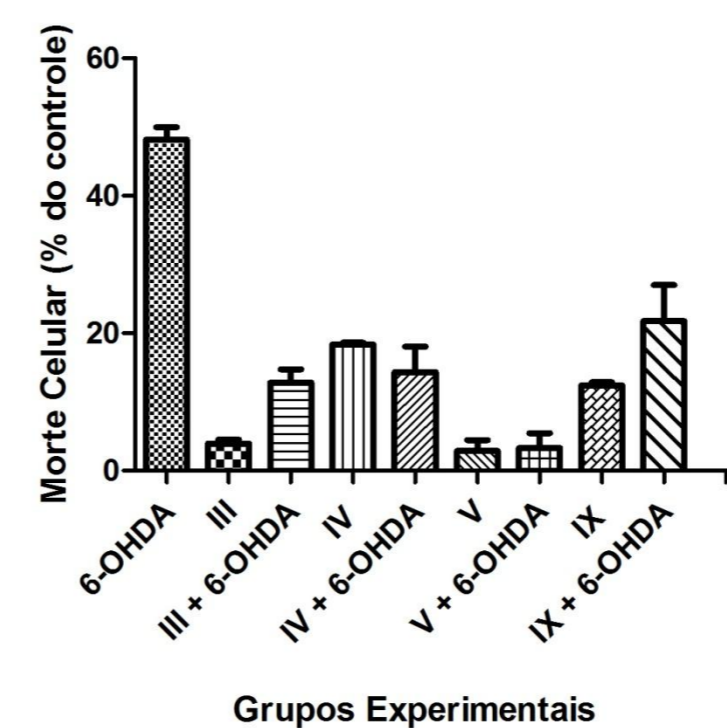


Fig. 7: Ensaio de neuroproteção. Células foram tratadas com cada um dos quatro compostos por 24hs. Então, 6-OHDA (DL= 15µM) foi adicionada ao meio durante 24hs e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT.

## Conclusões

Pré-tratamento com organocalcogênios mostraram diferentes níveis de potenciais efeitos neuroprotetores que, muito provavelmente, estão relacionados com sua atividade tiol-peroxidase "like". Esses dados sugerem um possível papel para compostos de organoselênios como potenciais drogas terapêuticas na DP.

Apoio Financeiro:



MCT/CNPq Universal (476114/2008-0)



MCT/CNPq INCT-TM (573671/2008-7).



PRONEX/FAPERGS (10/0027-4).



FINEP/IBN-Net (01060842-00)