



POTENCIAL NEUROPROTEÇÃO INDUZIDA PELA HARMINA EM CÉLULAS SH-SY5Y EXPOSTAS À COCAÍNA

Luana Aparecida Goulart Terra¹

Juliana Lígia Freires Ribeiro¹

Matheus Lujan Pereira¹

Fabiane Dörr¹

Tania Marcourakis¹

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP)

luanagoulartbiomedicina@gmail.com

Objetivos

O uso da cocaína está associado a importantes alterações no sistema nervoso central, como aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e ativação de vias pró-apoptóticas, contribuindo para processos de neurodegeneração e modulação da plasticidade neuronal [1]. Estudos recentes têm apontado o potencial efeito neuroprotetor de compostos presentes na ayahuasca, como a harmina, na modulação de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) e estimulação da neurogênese, pela ativação da via BDNF/TrkB/Akt /mTOR [2]. Considerando que o uso crônico da cocaína está associado ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) e à modulação negativa da plasticidade sináptica [1], este estudo tem como objetivo investigar o potencial efeito neuroprotetor da harmina frente à toxicidade induzida pela cocaína em células SH-SY5Y diferenciadas em neurônios dopaminérgicos [3]. Este modelo experimental apresenta perfil dopaminérgico maduro após diferenciação com ácido retinoico

e BDNF, sendo amplamente utilizado na investigação substâncias neuro-tóxicas e neuroprotetoras.

Métodos e Procedimentos

A diferenciação da SH-SY5Y foi realizada por protocolo sequencial com ácido retinoico (10 μ M) e BDNF (50 ng/ μ L), meio DMEM/Ham's F12 suplementado com soro fetal bovino (SFB) em concentrações decrescentes conforme a fase do protocolo. No décimo primeiro dia, as células diferenciadas foram consideradas aptas para os ensaios. Células diferenciadas (d-SH-SY5Y) e não diferenciadas (und-SH-SY5Y) foram expostas a concentrações crescentes de cocaína (1–10 mM) e harmina (1–2000 μ M) para determinação de CL50 e NOAEL por citometria de fluxo. Proteínas totais das células d-SH-SY5Y foram extraídas com tampão RIPA, quantificadas por BCA, separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF. Após incubação com anticorpos específicos, a detecção ocorreu por quimioluminescência.

Foram analisadas proteínas das vias BDNF/Akt/mTOR e ERK/MAPK (AKT, mTOR, p-mTOR, ERK1/2, p-ERK1/2, p70S6K, p-p70S6K), marcadores sinápticos/neurogênese (SNAP-25, DCX) e da via da quinurenina (IDO1, IDO2, KYNU, KMO, AADAT, HAAO), com parâmetros padronizados para garantir sensibilidade e reprodutibilidade.

Resultados

O protocolo de diferenciação gerou cultura homogênea, com arborização neurítica evidente e expressão aumentada de marcadores dopaminérgicos. Após 48 h, a cocaína reduziu a viabilidade das d-SH-SY5Y a partir de 4 mM (CL50: 4,8–6 mM; necrose) e das und-SH-SY5Y a partir de 2,5 mM (CL50: 2,8–4 mM; apoptose). Para harmina, a viabilidade das d-SH-SY5Y diminuiu a partir de 250 µM (NOAEL: 50 µM), enquanto nas und-SH-SY5Y a redução ocorreu a partir de 100 µM (NOAEL: 1 µM). Padronizou-se a carga de 15 µg de proteínas das células d-SH-SY5Y. A eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida com concentrações ajustadas ao peso molecular de cada proteína. Para proteínas de alto peso molecular, como mTOR e p-mTOR (~289 kDa), foram utilizados géis a 8%, enquanto proteínas de menor peso molecular, como HAAO (~33 kDa), requereram géis a 17% para evitar migração excessiva. Para os demais, gel a 15% foi adequado. Após transferência para membranas de PVDF, foi realizado bloqueio com leite desnatado 5% em TBS-T, seguido de incubação com anticorpos primários e secundários específicos nas diluições otimizadas para cada marcador. A detecção foi feita por quimioluminescência, com ajustes no tempo de revelação. Na via BDNF/Akt/mTOR, todos os marcadores foram detectados com bandas nítidas. Ajustes específicos, como aumento da carga proteica para 20 µg – para DCX e IDO2, por exemplo – diluição de anticorpos – AADAT e KMO – e tempo de corrida – isoformas de ERK1/2 (42 e 44 kDa) – foram necessários. Essas otimizações permitiram a obtenção de bandas específicas, de alta definição e baixo

background para todos os alvos analisados. Essa padronização garante a qualidade e reprodutibilidade dos dados e estabelece a base metodológica para futuras investigações sobre a modulação das vias de neuroplasticidade pela harmina frente à exposição à cocaína.

Conclusões

Nossos dados mostram a importância que o estado de maturação celular tem em estudos de neurotoxicidade. A padronização do *Western blotting* foi bem-sucedida, permitindo a detecção de todas as proteínas de interesse. Temos uma base sólida para avaliar os efeitos da cocaína e da harmina em parâmetros de estresse oxidativo e neurogênese.

Declaração Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Todos os autores aprovaram a versão final do resumo.

Referências

- [1] WEN, X. et al. *Cocaine-induced mitochondrial dysfunction: mechanisms and implications*. Toxicology Letters, Amsterdam, v. 369, p. 71–83, 2022.
- [2] FORTUNATO, J. J. et al. *Chronic administration of harmine elicits antidepressant-like effects and increases BDNF levels in rat hippocampus*. Journal of Neural Transmission, Wien, v. 116, n. 4, p. 515–520, 2009.
- [3] AMINI, R.; WHITE, J. H. *Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype: a neuronal model for studying neurodegeneration and neuroprotection*. Neurotoxicity Research, New York, v. 39, n. 3, p. 999–1010, 2021.