

PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO PARA VISUALIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RODS DE ACTINA/COFILINA-1 EM ADENOCARCINOMA HUMANO DE PULMÃO A549

Carolina P. Chatain¹, Fabio Klamt¹

¹Departamento de Bioquímica, Laboratório de Bioquímica Celular (Lab. 24), ICBS / UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil; *Email:* carolpchatain@gmail.com; 00025267@ufrgs.br

INTRODUÇÃO

A cofilina-1 é uma proteína envolvida na dinâmica dos filamentos de actina. Quando muito ativa, ela pode se acumular juntamente com a actina e formar inclusões em forma de bastão, chamadas *rods* de actina/cofilina-1¹, conforme ilustrado na Figura 1². Essas estruturas vêm sendo extensivamente estudadas na área de neurociência, uma vez que parecem estar relacionadas com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas³. Apesar de terem sido visualizados em outros tecidos, efeitos decorrentes da presença de *rods* nesses tipos celulares nunca foram descritos. Uma vez que a actina está envolvida em processos como divisão, invasão e migração, a possível presença de *rods* em células cancerígenas poderia estar associada a iniciação e progressão tumoral⁴.

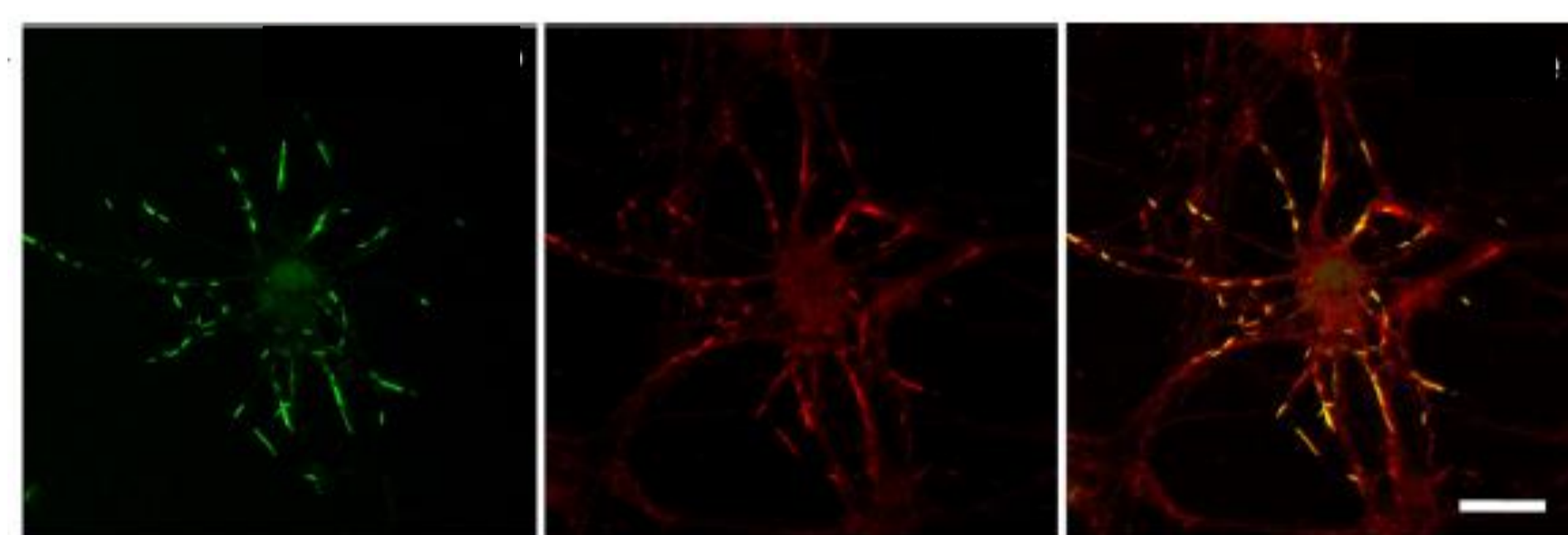


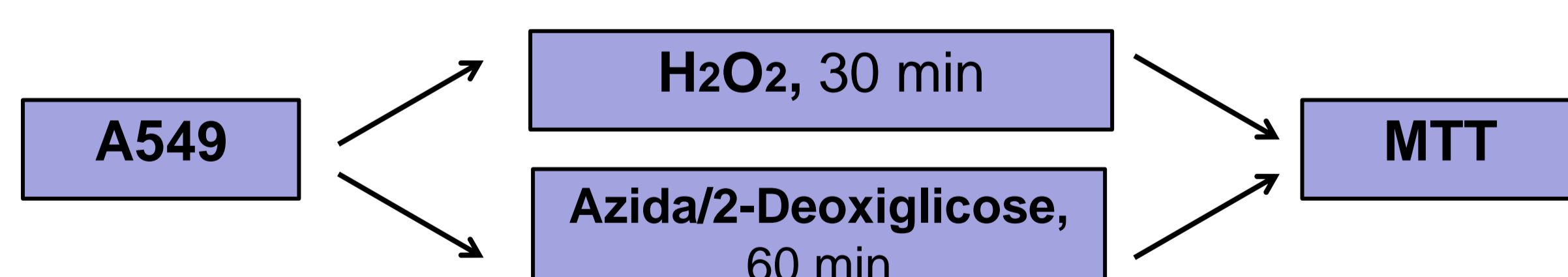
Figura 1 – Rods de actina (vermelho) e cofilina (verde) em cultura primária de neurônios².

OBJETIVOS

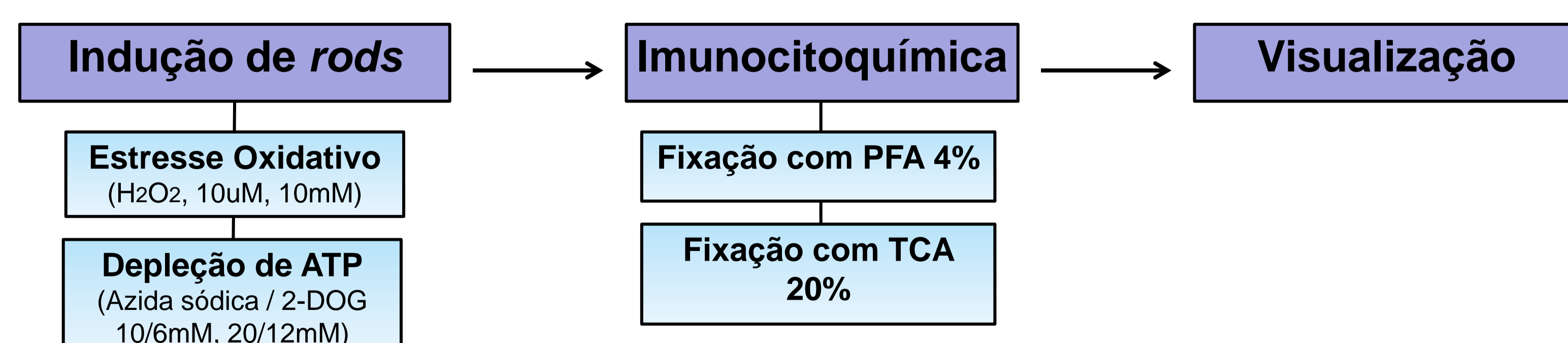
Investigar métodos de indução e visualização de *rods* de actina e cofilina-1 em adenocarcinoma humano A549 para futuro estudo de seus efeitos sobre a viabilidade celular e resistência a fármacos na linhagem.

MÉTODOS

Curva de dose



Imunocitoquímica



REFERÊNCIAS

- ¹ Bamberg, J.R. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 185–230 (1999).
- ² Whiteman, I. T. *et al.* Activated Actin-Depolymerizing Factor/Cofilin Sequesters Phosphorylated Microtubule-Associated Protein during the Assembly of Alzheimer-Like Neuritic Cytoskeletal Striations. *The Journal of Neuroscience.* 29(41),12994 –13005 (2009).
- ³ Bamberg, J.R. *et al.* ADF/Cofilin-Actin Rods in Neurodegenerative Diseases. *Current Alzheimer Research.* 7, 1-10 (2010).
- ⁴ Stevenson, R. P. *et al.* Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. *Journal of Cell Science.* 125, 1073–1079 (2012).

RESULTADOS

Viabilidade Celular

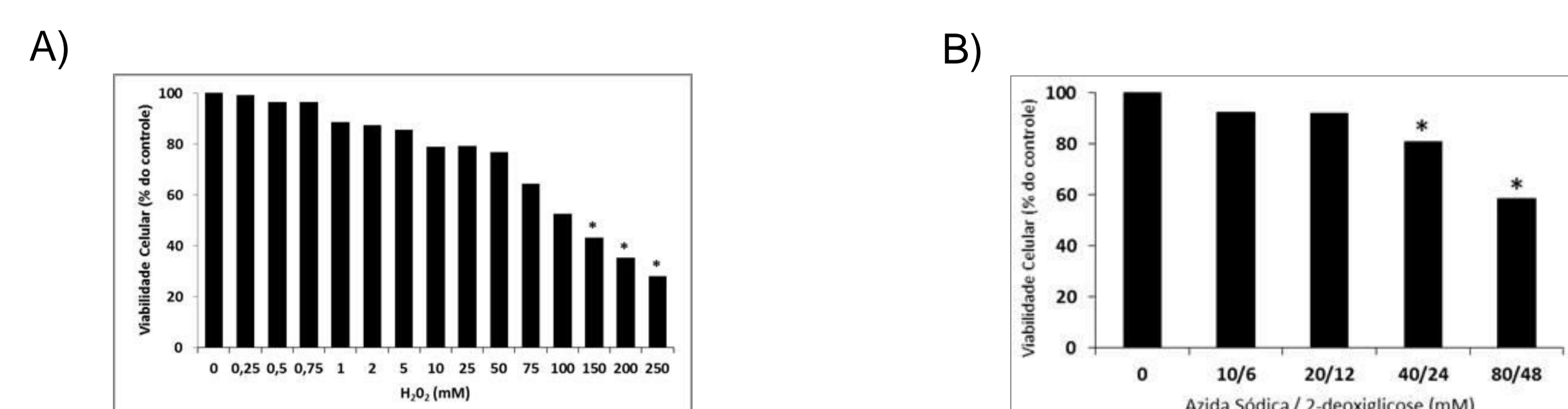
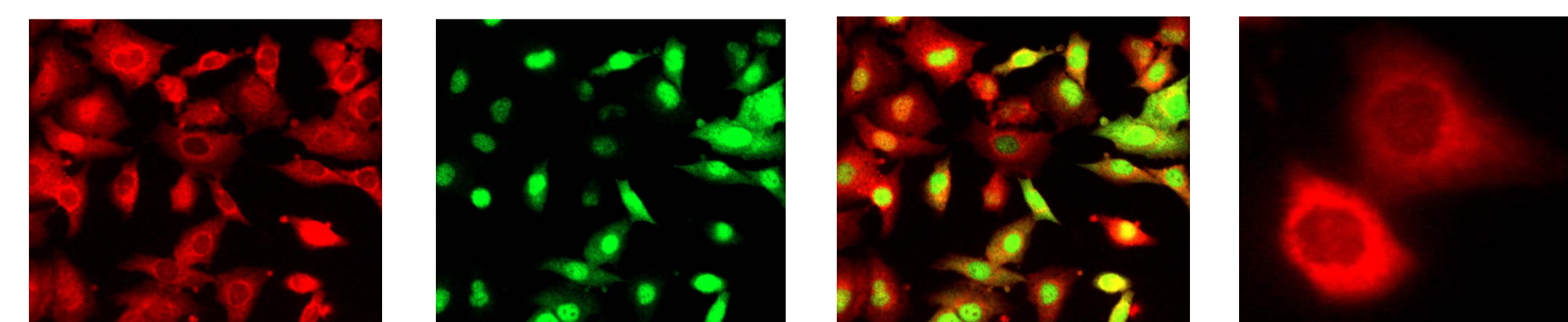


Figura 2: Viabilidade celular de adenocarcinoma humano A549 após tratamento (A) com H₂O₂ por 60 minutos e (B) com meio de depleção de ATP (azida sódica + 2-deoxiglicose) por 30 minutos.

Fixação

1. Paraformaldeído 4%



2. TCA 20%

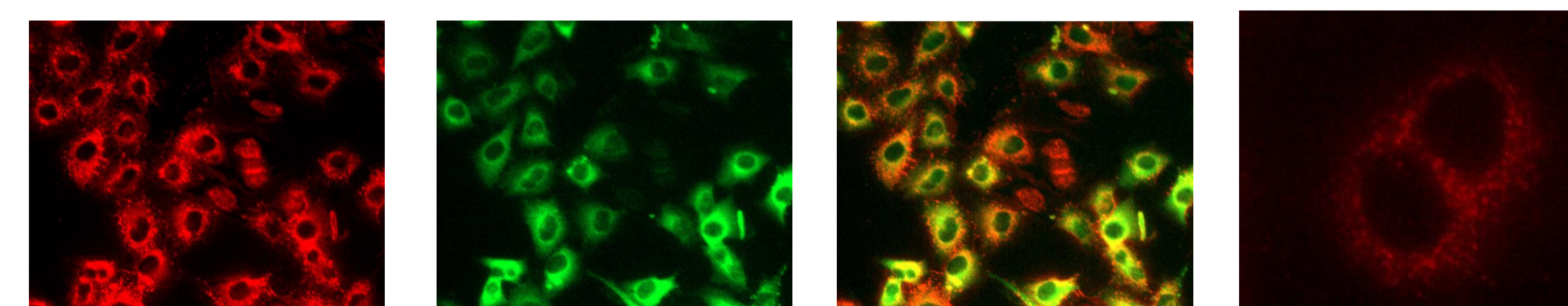


Figura 3: Comparação entre os métodos de fixação com paraformaldeído 4% e TCA 20% em imunocitoquímica de células A549 marcadas com anticorpos anti-actina (vermelho) e anti-cofilina (verde). A fixação com TCA 20% forma agregados protéicos que impossibilitam a visualização de possíveis rods que possam estar presentes nas células.

Imunocitoquímica

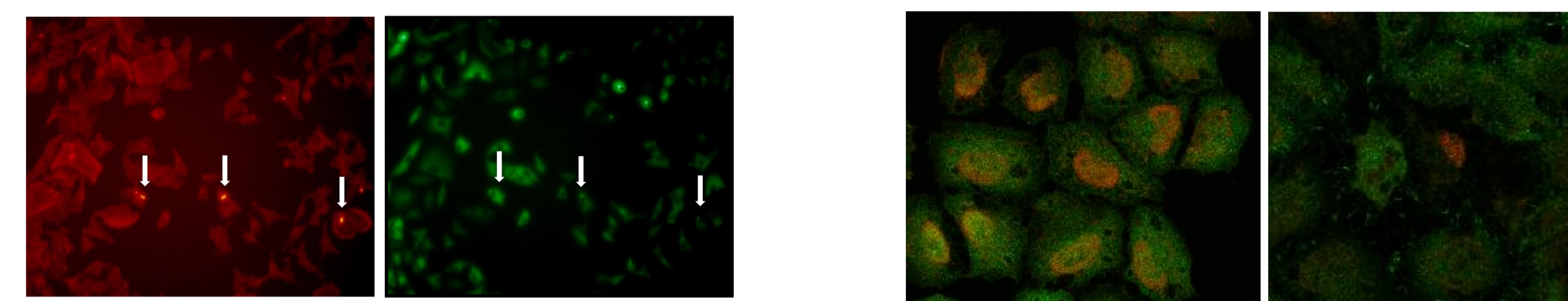


Figura 4: Acúmulos de actina (vermelho) e cofilina (verde) co-localizados após tratamento com meio de depleção de ATP (10mM azida sódica e 6mM de 2-DOG) por 30 minutos.

Figura 4: Microscopia confocal mostrando a diferença entre células controle (à esquerda) e tratadas com 10mM de H₂O₂ por 60 minutos (direita). Nestas pode-se observar a presença de agregados de cofilina (verde), porém sem co-localização de actina.

PERSPECTIVAS

O trabalho demonstrou que mais estudos devem ser realizados para que a presença ou ausência de rods de actina/cofilina-1 seja determinada. Apesar dos resultados inconclusivos, algumas imagens sugerem que essas estruturas podem estar presentes após indução com peróxido de hidrogênio e mistura de azida sódica e 2-DOG, que mimetizam condições existentes no microambiente tumoral. Assim, é preciso apurar as técnicas para que os acúmulos protéicos encontrados possam ser melhor definidos.