

Stapenhorst, F., Londero, G. F., Lopes, F. M., Marengo, L., Moreira, J. C. F., Klamt, F.

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: fernanda.stapenhorst@gmail.com / 00025267@ufrgs.br

INTRODUÇÃO:

A Diabetes Mellitus é uma desordem metabólica caracterizada pela elevação da taxa de glicose sanguínea e a progressiva falha e perda das células beta pancreáticas. A neuropatia diabética é uma doença lenta e progressiva que causa distúrbios nos nervos periféricos e autonômicos. Geralmente, é causada pelo inadequado controle da glicemia. O estresse oxidativo pode ter um papel fundamental no dano causado ao sistema nervoso pela exposição prolongada a altos níveis de glicose no sangue. Entretanto, fatores e mecanismos da glicotoxicidade em células neurais são ainda desconhecidos e existem poucos estudos investigando esta relação. Formados endogenamente como intermediários da via glicolítica ou em reações não enzimáticas da fragmentação de açúcares, as espécies carbonil reativas metilgloxal, gloxal e glicolaldeído, devem contribuir para a toxicidade da hiperglicemia não controlada. O metilgloxal acumula em condições como hiperglicemia, defeitos no metabolismo da glicose, ou estresse oxidativo. O glicolaldeído é produzido pela fragmentação de açúcares nos estágios iniciais da glicosilação não enzimática e é parcialmente responsável pela produção de produtos de glicação avançados (AGEs), podendo levar a complicações diabéticas. Glicolaldeído pode originar gloxal, o qual é altamente reativo e pode interagir com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. A glicação é um processo endógeno que participa da modificação pós-traducional das proteínas. O estágio inicial da glicação envolve a reação da glicose com o grupo amino dos resíduos de lisina das proteínas, formando bases de Schiff e frutamina, as quais são convertidas em AGEs. A glicação e formação de AGEs tem sido associada a diabetes e as suas complicações, e já está bem estabelecida a sua associação com doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica. Como modelo experimental foi usada a linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciada. Esta foi desafiada com as glicotoxinas metilgloxal, gloxal e glicolaldeído. No intuito de descobrir novos alvos de oxidação, utilizamos uma técnica para marcar com fluorescência tióis protéicos oxidados e depois separá-los por eletroforese bidimensional (2-DE). Nossos dados serão comparados aos de células tratadas com 6-hidroxidopamina, como um controle de morte neuronal mediada por oxidação, e serão discutidos no sentido de caracterizar potencial alvos de intervenção terapêutica.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS:

Cultura celular e diferenciação – A linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y foi mantida em uma mistura 1:1 de Ham's F12 e Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementada com 10% SFB, em uma atmosfera umidificada de 5% de CO₂ a 37 °C. 24 horas após o plaqueamento das células a diferenciação foi induzida pela redução do SFB a 1% e a adição de 10 μM de ácido retinóico durante 7 dias. Este tratamento foi repetido a cada 3 dias.

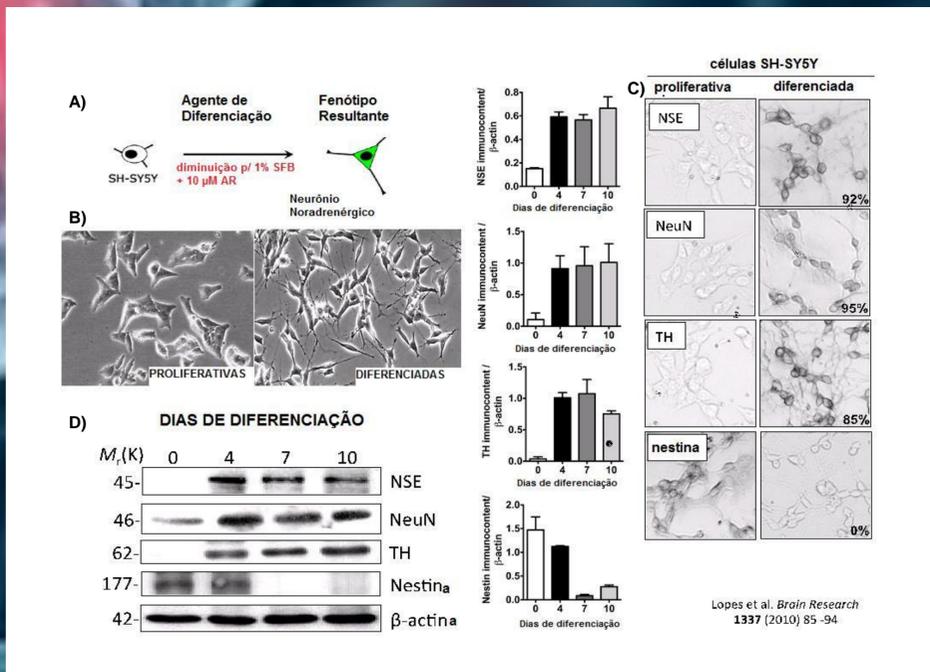


Fig. 1: Modelo experimental *in vivo* para estudos da doença de Parkinson utilizando células SH-SY5Y diferenciadas com ácido retinóico. (A) Representação da diferenciação induzida pelo ácido retinóico. (B) Imagem representativa em contraste de fase das células SH-SY5Y proliferativas e diferenciadas. Observa-se a aquisição de morfologia estrelada e a abundância de neuritos. (C) Imagens representativas de imunistoquímica e (D) western blotting mostrando o conteúdo de marcadores neuronais e de células indiferenciadas durante a diferenciação. β-actina foi usada como controle da quantidade protéica. Os dados representam a média ± SD de três experimentos independentes.

Citotoxicidade da 6-Hidroxidopamina (6-OHDA), Metilgloxal, Gloxal e Glicolaldeído – As citotoxicidades foram avaliadas pela exposição das células a diferentes concentrações destas toxinas por 24 ou 48 horas a 37 °C, e a viabilidade celular foi estimada pelo teste de MTT.

Espécies reativas totais – A produção de espécies reativas foi estimada pelo teste de DCF-DA utilizando-se um leitor de fluorescência para placas SoftMax.

Potencial da Membrana Mitocondrial (ΔΨ_m) – A perda do potencial foi avaliada através do teste de JC-1. Foi utilizado um leitor de fluorescência para placas SoftMax. ΔΨ_m foi estimado utilizando a razão de 590 nm (forma agregada) / 540 nm (forma monomérica).

RESULTADOS:

Marcação fluorescente dos tióis protéicos e 2-D eletroforese – Após tratamento das células SH-SY5Y com o valor de DL50 da 6-OHDA por 24 horas, estas foram raspadas e um extrato protéico foi feito. Este foi utilizado para a execução de redox proteoma, onde os grupamentos tióis das proteínas foram marcados com fluorescência. Após a marcação, 2D-eletroforese foi realizada. As proteínas são separadas inicialmente por ponto isoeletrico e depois por peso molecular. Após a eletroforese, os géis são escaneados com um sistema de imagem Galiance 600 PerkinElmer®, fixados e corados com nitrato de prata ou Coomassie Brilliant blue. (figure 6).

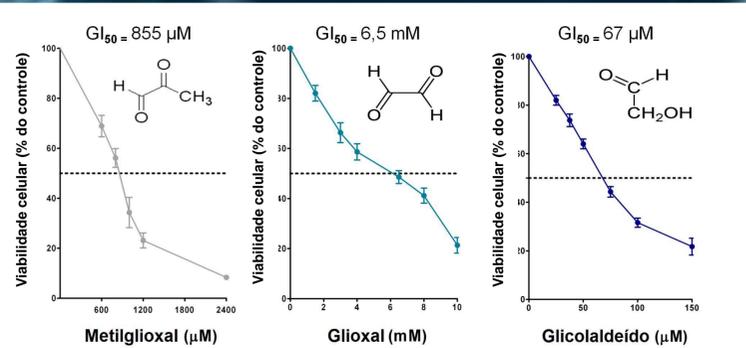


Fig. 2: A citotoxicidade do metilgloxal, gloxal e glicolaldeído na linhagem celular SH-SY5Y diferenciada. As células foram expostas a diferentes concentrações dessas glicotoxinas por 48h a 37 °C, e a citotoxicidade foi avaliada por teste MTT. Os valores de DL50 foram encontrados para cada uma das glicotoxinas e estão representados pela linha pontilhada. Os dados representam a média ± SD de três experimentos independentes.

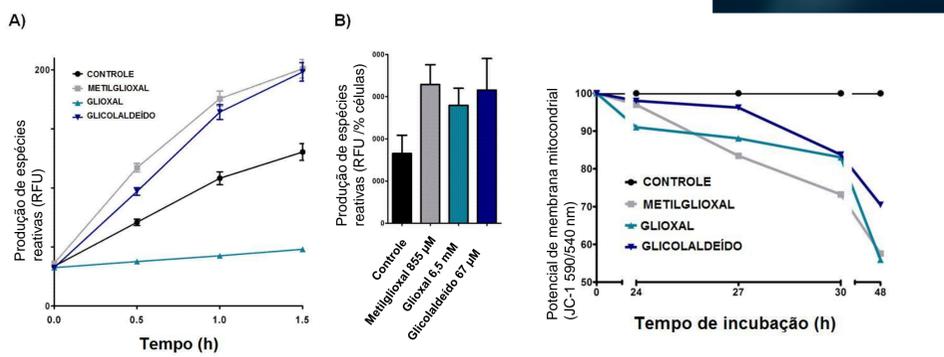


Fig. 3: Avaliação da produção de espécies reativas na linhagem celular SH-SY5Y diferenciada gerada pelas glicotoxinas metilgloxal, gloxal e glicolaldeído, representada como (A) curva de tempo e (B) após 48 horas de exposição. As células foram desafiadas com o DL 50 das glicotoxinas e o teste de DCF foi realizado.

Fig. 4: Potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ_m) na linhagem celular SH-SY5Y diferenciada desafiada com as glicotoxinas metilgloxal, gloxal e glicolaldeído. A perda do potencial da membrana mitocondrial foi avaliada por JC-1 após o tratamento com o DL50 de cada glicotoxina durante 48 horas.

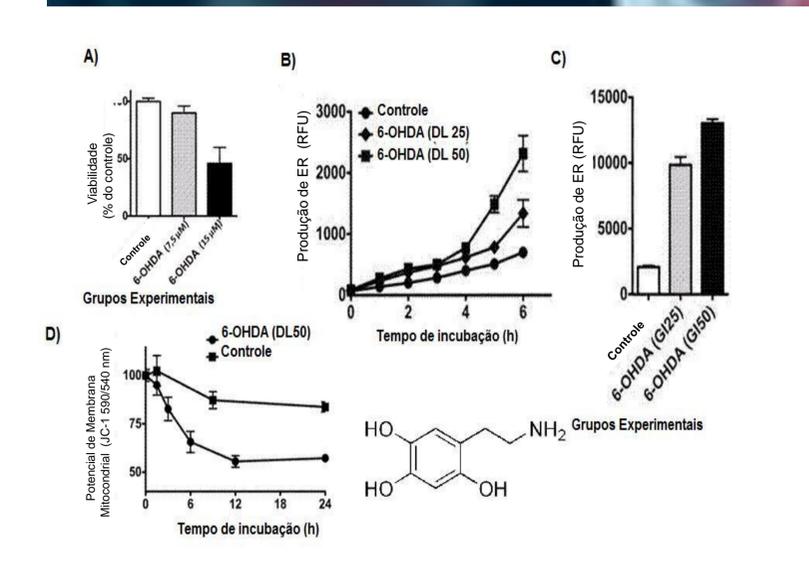


Fig. 5: Dados da 6-OHDA (A) A citotoxicidade foi avaliada por teste MTT após a exposição a diferentes doses de 6-OHDA por 24 horas. A avaliação da produção de espécies reativas gerada pela 6-OHDA foi feita por teste de DCF-DA e representada como (B) curva de tempo e (C) após 24 horas de exposição. (D) Potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ_m) nas células tratadas 6-OHDA foi avaliado por JC-1. As células tratadas com o DL50 da 6-OHDA perderam o (ΔΨ_m) em 6 horas. Os dados representam a média ± SD de três experimentos independentes.

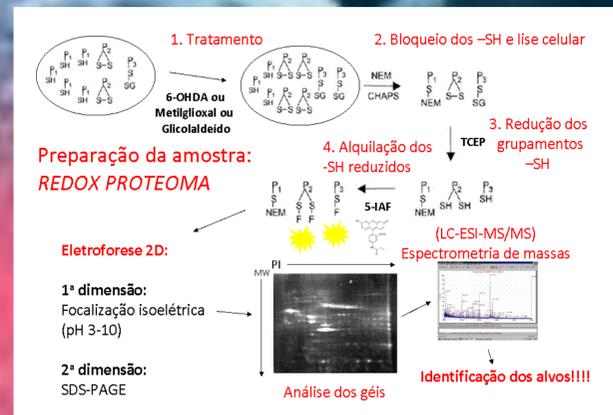


Fig. 6: Os grupos tióis das cisteínas encontram-se nas células reduzidos ou oxidados (formando pontes dissulfeto, ligados a glutatona ou outras moléculas). Ao se usar algum tipo de tratamento na célula, no caso o DL50 da 6-hidroxidopamina, o estado redox das cisteínas pode ser alterado. Para analisar a oxidação das cisteínas faz-se o bloqueio dos grupos tióis reduzidos através da incubação com N-ethylmaleimida (NEM), após reduz-se os grupos tióis oxidados através da incubação com TCEP. Os grupos tióis reduzidos, não bloqueados com NEM, são alquilados com 5-iodoacetamidofluoresceína (5-IAF). Realiza-se a 2D-eletroforese e visualiza-se o gel no transiluminador onde as proteínas contendo cisteínas oxidadas aparecem com pontos fluorescentes. Esses pontos podem ser recortados do gel e analisados por espectrometria de massas.

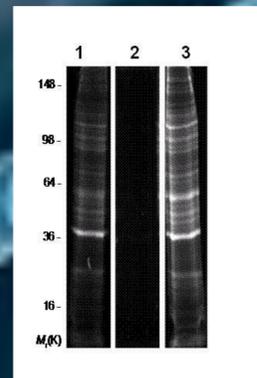


Fig. 7: Otimização das condições experimentais para bloqueio com NEM e marcação com 5-IAF dos tióis protéicos oxidados, usando SDS-PAGE. Linha 1: Tióis reduzidos foram primeiramente bloqueados com NEM e, depois os tióis oxidados foram reduzidos com TCEP. Linha 2: Tióis foram totalmente reduzidos com TCEP e depois o bloqueio total foi feito com NEM. Linha 3: As células foram previamente tratadas com 200 μM de H₂O₂ por 1 hora e depois o bloqueio e redução, como descrito na linha 1, foi executado. 20 μg de cada extrato protéico tratado foram marcados com 5-IAF e usados para o SDS-PAGE.

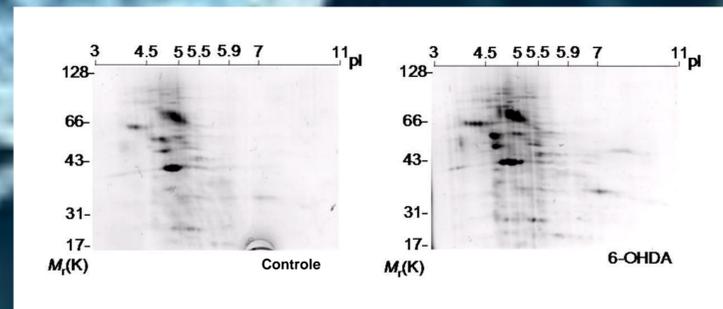


Fig. 8: Separação por 2-D PAGE das proteínas oxidadas marcadas com 5-IAF. Experimentos feitos na linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciada, sem (A) e com (B) o tratamento com 6-OHDA. As células foram tratadas com a dose de DL50 da 6-OHDA, e o redox proteoma foi executado conforme descrito na figura 6. Os dados representam experimentos feitos em triplicatas.

CONCLUSÕES

Os testes de viabilidade mostraram uma diminuição na sobrevivência celular com os tratamentos com metilgloxal, gloxal e glicolaldeído. As doses de DL50 foram determinadas em um tempo de 48 horas. Tanto o tratamento com metilgloxal quanto o com glicolaldeído induziram um aumento na produção de espécies reativas, o qual está relacionado com a perda da viabilidade celular. Entretanto, as células tratadas com gloxal apresentaram uma diminuição inicial na quantidade de espécies reativas, porém com 48 horas de tratamento, todas as glicotoxinas causam um aumento de espécies reativas. Isto sugere que o mecanismo de oxidação do gloxal deve ser indireto. Experimentos de curva de tempo mostraram que a perda do potencial de membrana ocorre 48 horas após os tratamentos com metilgloxal e gloxal, e não foi significativo para o glicolaldeído. Os mecanismos que levam a morte celular gerada pelo glicolaldeído não devem ser via despolarização mitocondrial.

A técnica de marcação com fluorescência dos grupamentos tióis protéicos oxidados e separação por eletroforese bidimensional é uma ferramenta útil para descobrir novos alvos de oxidação e, assim, estudar os mecanismos de sinalização redox. Utilizando este mecanismo de marcação fluorescente, nós detectamos mudanças no padrão de oxidação dos tióis protéicos das células SH-SY5Y diferenciadas antes e após o tratamento com 6-OHDA. Esta técnica deve ser útil, também, para caracterizar proteínas sensíveis a oxidação pelas glicotoxinas, identificando alvos de oxidação das mesmas.