

EFEITOS DO TRATAMENTO COM GLIOXAL EM PARÂMETROS LOCOMOTORES, OXIDATIVOS E NA VIABILIDADE DAS ARTÊMIAS SALINA

Caroline Siqueira Lena ¹

Eduarda Acunha Scheeren ²

Priscila Carrazoni dos Santos ³

Lara Pedroso da Fontoura ⁴

Matheus Chimelo Bianchini ⁵

Daniel Henrique Roos ⁶

Resumo:

O glioxal é um metabólito formado pela peroxidação de lípidos ou degradação oxidativa da glicose, e ainda da degradação das proteínas glicadas. O glioxal é capaz de induzir danos celulares, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e glicação de proteínas, levando a produtos finais de glicação avançada (AGEs), os quais, também podem contribuir para citotoxicidade (SHANGARI; O'BRIEN, 2004). Os níveis de glioxal em pessoas saudáveis podem chegar a 230 nM sendo que essa concentração em diabéticos pode subir pra 470 nM, entretanto sua concentração em tecidos específicos como fígado pode ser 1000 vezes maior. Assim quando as concentrações aumentam, há potencial para problemas de saúde e doenças (TSUTSUI et al., 2017). O glioxal revelou um potencial citotóxico que manifestou-se em danos locomotores e geração de ROS. Nosso trabalho mostra que em parte a toxicidade causada pelo glioxal pode ter sido ocasionada pelo aumento das ROS. Este é o primeiro trabalho que mostra o efeito da exposição do glioxal em Artêmias. Assim, este estudo contribui para um melhor entendimento dos efeitos do Glioxal e mostra que as artêmias são um bom modelo para indicar não apenas ensaios de toxicidade, mas também bioquímicos.

Palavras-chave: GLIOXAL, ROS, AGEs, ARTÊMIAS

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

EFEITOS DO TRATAMENTO COM GLIOXAL EM PARÂMETROS LOCOMOTORES, OXIDATIVOS E NA VIABILIDADE DAS ARTÊMIAS SALINA

¹ Aluno de graduação. carolinesiqueiralena@hotmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. acunhaeduarda@gmail.com. Co-autor

³ Aluno de graduação. prika.carrazoni@gmail.com. Co-autor

⁴ Aluno de pós-graduação. yuri.beltram07@gmail.com. Co-autor

⁵ Aluno de pós-graduação. danielvarzeano@yahoo.com.br. Co-autor

⁶ Docente. danielroos@unipampa.edu.br. Orientador



EFEITOS DO TRATAMENTO COM GLIOXAL EM PARÂMETROS LOCOMOTORES, OXIDATIVOS E NA VIABILIDADE DE ARTÊMIAS SALINA

1. INTRODUÇÃO

O glioxal é um metabólito formado pela peroxidação de lípidos ou degradação oxidativa da glicose, e ainda da degradação das proteínas glicadas. O glioxal é capaz de induzir danos celulares, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e glicação de proteínas, levando a produtos finais de glicação avançada (AGEs), os quais, também podem contribuir para citotoxicidade (SHANGARI; O'BRIEN, 2004). O glioxal predominantemente modifica resíduos de lisina e arginina de proteínas podendo dessa forma levar uma inativação ou perda parcial de sua função (CLEARY; MALTHOUSE, 2016).

Os níveis de glioxal em pessoas saudáveis podem chegar a 230 nM sendo que essa concentração em diabéticos pode subir pra 470 nM, entretanto sua concentração em tecidos específicos como fígado pode ser 1000 vezes maior. Assim quando as concentrações aumentam, há potencial para problemas de saúde e doenças (TSUTSUI et al., 2017).

2. METODOLOGIA

Esse trabalho foi realizado utilizando uma cultura de artêmias salina tratadas por 24 h com Glioxal. Entende-se por cultura, um tratamento para induzir a eclosão dos cistos de artêmia salina. Esse tratamento é realizado da seguinte forma: pesa-se 0,4 g de cistos, trata-se com 20 mL de hipoclorito e 1500 µL de NaOH 0,5 M até os cistos adquirirem coloração dourada. Esses cistos são filtrados, lavados e transferidos para 1 L de água salina 4,17 M com 2-3 gotas de anti-cloro, mantidas em uma temperatura entre 28°C – 29°C e com oxigenação, durante 24 h. As artêmias utilizadas tinham 48h após a eclosão o que corresponde ao estágio larval L2 e L3.

Para determinação da LC₅₀ foram utilizados os seguintes grupos experimentais: Controle, Glioxal (5 mM, 10 mM, 25 mM e 50 mM). Uma população de 10 artêmias em um volume final de 5 mL de água do mar artificial foram colocadas em tubos de ensaio. A avaliação da atividade locomotora foi realizada através de teste de nado em campo aberto (tipo open field). Esse teste consiste em quantificar o número de quadrantes percorridos pelas artêmias durante 1 minuto. A arena utilizada para esse teste é um poço (placa de cultura 12 poços) contendo 750 µL de água salina, com temperatura controlada de 28°C, cada quadrante mede (0,5X0,5 cm) conforme figura 1, para essa avaliação foram utilizados os seguintes grupos experimentais: Controle, glioxal (5 mM, 10 mM e 20 mM).

Na análise fluorimétrica quantitativa de geração de ROS pela oxidação da DCFH, foram utilizadas 10 artêmias por grupo, previamente tratadas por 24h nas concentrações de (1 - 10 mM) de glioxal. As leituras foram realizadas de forma cinética nos períodos de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos no leitor de microplacas MI-5.

Utilizando o mesmo tratamento da análise quantitativa, foi realizada uma análise qualitativa por imagem após 30 minutos de exposição a DCFH (figura 5).

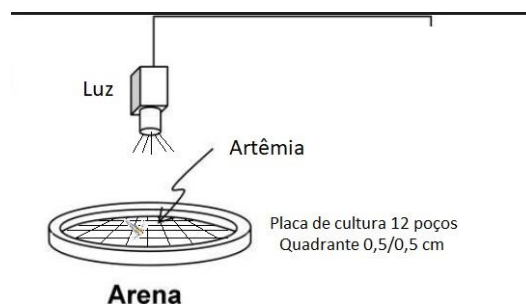


Figura 1: Representação do teste de nado em campo aberto (tipo open field).

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A figura 2 mostra o efeito do glioal na viabilidade das artêmias. Após 24h de exposição o glioal nas concentrações de 25 mM e 50 mM causaram uma redução significativa na viabilidade das artêmias. A LC_{50} calculada do Glioal foi determinada em 25,16 mM (figura 2).

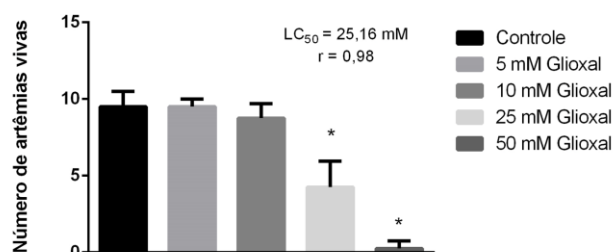


Figura 2: Determinação da LC_{50} do tratamento com glioal por 24 h. * indica $\neq$ significativa em relação ao controle. $P < 0,05$. $n = 4$

A figura 3 mostra a avaliação locomotora em teste de nado em campo aberto. Os resultados sugerem que glioal a partir da concentração de 10 mM causa danos locomotores significativos em 24 h de tratamento (figura 3).

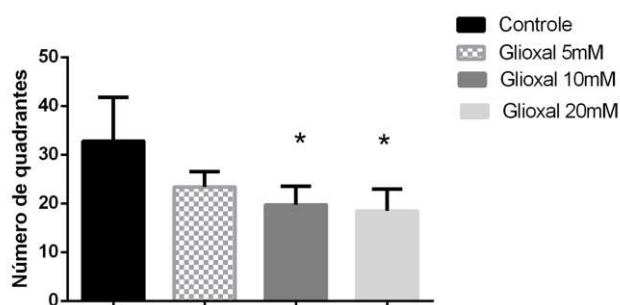


Figura 3: Teste de nado em campo aberto. * indica $\neq$ significativa em relação ao controle. $P < 0,05$. $n = 4 - 6$

A figura 4 mostra a geração de ROS nas artêmias após 24h de tratamento. Apenas o Glioal 10 mM causou um aumento significativo na geração de ROS em relação ao controle.

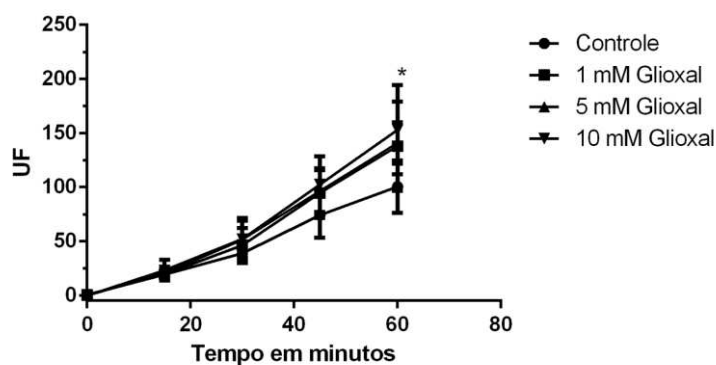


Figura 4: Análise quantitativa da geração de ROS pela fluorescência da oxidação da DCFH. * indica ≠ significativa (10 mM em relação ao controle). $P < 0,05$. $n = 8$

A figura 5 mostra o efeito do tratamento com diferentes concentrações de Glioxal na geração de ROS, onde é possível observar um aumento gradual dessas espécies pela maior fluorescência.

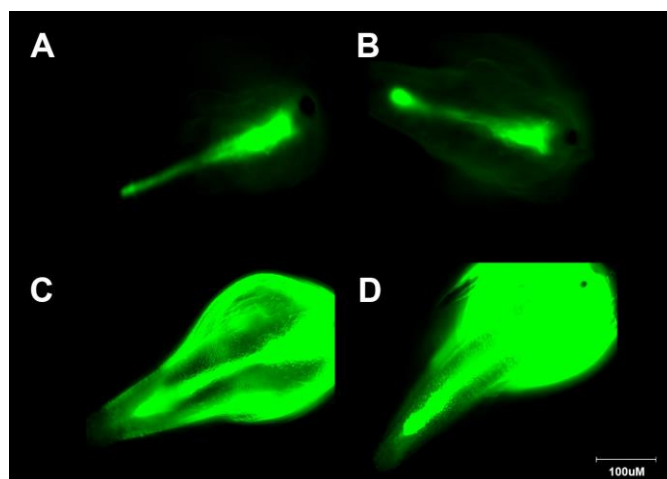


Figura 5: Análise qualitativa da geração de ROS pela fluorescência da oxidação da DCFH. Figura representativa de uma artêmia por grupo. A= controle; B= glioxal 1 mM; C= glioxal 5 mM; D= glioxal 10 mM

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O glioxal revelou um potencial citotóxico que manifestou-se em danos locomotores e geração de ROS. Nosso trabalho mostra que em parte a toxicidade causada pelo glioxal pode ter sido ocasionada pelo aumento das ROS. Porém estudos futuros poderão dizer se esse aumento foi devido a maior produção de ROS e/ou diminuição da atividade do sistema antioxidante, e também, se esses tratamentos mostram efeitos crônicos, visto que nosso trabalho avaliou efeitos agudos do tratamento com glioxal. Muitos trabalhos relacionam a geração de ROS com a toxicidade do glioxal porém os mecanismos acerca deste fenômeno não estão completamente entendidos. Ainda, este é o primeiro trabalho que mostra o efeito da exposição do glioxal em Artêmias. Assim, este estudo contribui para um melhor entendimento dos efeitos do Glioxal e mostra que as artêmias são um bom modelo para indicar não apenas ensaios de toxicidade, mas também bioquímicos.

5. REFERÊNCIAS

Periódicos técnico-científicos

CLEARY, Jennifer A.; MALTHOUSE, J. Paul G. A new lysine derived glyoxal inhibitor of trypsin, its properties and utilization for studying the stabilization of tetrahedral adducts by trypsin. *Biochemistry And Biophysics Reports*, [s.l.], v. 5, p.272-284, mar. 2016. Elsevier BV.

SHANGARI, Nandita; O'BRIEN, Peter J.. The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*, [s.l.], v.68, n.7, p.1433-1442, out. 2004. Elsevier BV.

TSUTSUI, Ayumi et al. Effect of spermine-derived AGEs on oxidative stress and polyamine metabolism. *Org. Biomol. Chem.*, [s.l.], v. 15, n. 32, p.6720-6724, 2017. Royal Society of Chemistry (RSC).