AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO GENE X AMBIENTE.

Sue Ellen Gabriela Girón de Souza [1]

Daiana Silva De Avila [2]

Resumo:

As doenças neurodegenerativas podem surgir dos mais diversos fatores, sendo eles ambientais ou genéticos, afetando de maneira progressiva e degenerativa pessoas de diferentes idades. Caracterizam-se por causarem morte das células do sistema nervoso (destruição de neurônios), afetando a substância cinzenta do cérebro, e secundariamente as funções ligadas à substância branca. As doenças neurodegenerativas possuem um fator genético, mas também se encontram associadas à exposição dos indivíduos a diferentes metais neurotóxicos encontrados no ambiente, como por exemplo, o manganês (Mn) (Aschner et al., 2009). O Mn é um metal essencial aos animais, mas quando se é exposto a níveis elevados o resultado será o manganismo, uma condição neurológica que é caracterizada pela sinalização anormal da dopamina (DA), pelo estresse oxidativo, e a morte celular (Jeffrey E. Post, 1999).

Palavras-chave: Huntignton, Caenorhabditis Elegans

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO GENE X AMBIENTE.

[1] Aluno de graduação. gabygiron88@gmail.com. Autor principal

[2] Docente. daianaavila@unipampa.edu.br. Orientador

9º SIEPE SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO
o conhecimento vai além das fronteiras
21 a 23 de novembro de 2017
Fronteira da Paz
Universidade Federal do Pampa
Campus Santana do Livramento

Avaliação da relação gene x ambiente: efeitos do manganês na Doença de Huntington em *Caenorhabdtis elegans*

1. INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas podem surgir dos mais diversos fatores, sendo eles ambientais ou genéticos, afetando de maneira progressiva e degenerativa pessoas de diferentes idades. Caracterizam-se por causarem morte das células do sistema nervoso (destruição de neurônios), afetando a substância cinzenta do cérebro, e secundariamente as funções ligadas à substância branca.

As doenças neurodegenerativas possuem um fator genético, mas também se encontram associadas à exposição dos indivíduos a diferentes metais neurotóxicos encontrados no ambiente, como por exemplo, o manganês (Mn) (Aschner et al., 2009). O Mn é um metal essencial aos animais, mas quando se é exposto a níveis elevados o resultado será o manganismo, uma condição neurológica que é caracterizada pela sinalização anormal da dopamina (DA), pelo estresse oxidativo, e a morte celular (Jeffrey E. Post, 1999).

Diferentes animais têm sido utilizados ultimamente para estudar os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade do Mn e seu potencial papel em doenças neurodegenerativas. Devido à homologia bioquímica com os mamíferos,o nematódeo *Caenorhabditis elegans (C. elegans)* tem sido utilizado. Entre outras vantagens, este verme não parasita possui tamanho pequeno, é transparente, e possui um ciclo de vida curto. Do ovo ao adulto leva cerca de 3 dias, aproximadamente o mesmo tempo necessário para cruzamentos genéticos em leveduras. Sua expectativa de vida é de cerca de 2 a 3 semanas sob condição de vida adequada. Em comparação com o uso de outros organismos modelo, como os camundongos, o ciclo de vida curto de *C. elegans* reduz o ciclo experimental e facilita o estudo biológico *(Donald, 1997; Kenyon, 19884; Wood, 1988*). Outra grande vantagem é a possibilidade de geração de cepas transgênicas como as que expressam a poliglutamina humana direcionada para todos os neurônios do verme, como é o caso da cepa AM101 (rmIs110 [F25B3.3p::Q40::YFP], a qual permite a observação de agregados neuronais marcados com proteína amarelo fluorescente (YFP)(Gidalevitz T, et al., 2006).

Neste trabalho utilizamos *C. elegans* mutantes como modelo, com o objetivo de avaliar a resistência a toxicidade do Mn em vermes mutantes, pois foi observado a expressão de PolyQ mutante podendo estar associada à resistência à toxicidade do Mn

2. METODOLOGIA

Cultura de *C. elegans*

Utilizamos a cepa AM101 rmIs110 [F25B3.3p::Q40::YFP], que apresenta os agragados de poliQ marcados com YFP, além dacepa N2 (tipo selvagem).Os vermes foram adquiridos do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC – *University of Minnesota,* Twin Cities, MN)

Os vermes foram mantidos em condições padrão de cultura a 20°C, em placas de petri de plástico de 100 ou 150 mm de diâmetro contendo meio ágar 8P (3 g/L NaCl; 25 g/L ágar; 20

g/L peptona; 1 mM $CaCl_2$; 5 mg/L colesterol; 1 mM $MgSO_4$; 25 mM KPO_4^{-2}) contendo a linhagem NA22 de *Escherichia coli* (como alimento) para manutenção das culturas.

Exposição de *C. elegans* ao Mn

Foi realizada uma exposição aguda com $MnCl_2$, utilizando 1500 vermes na fase L1. Os vermes foram expostos por 30 minutos em diferentes concentrações de Mn (10mM a 200mM), em duplicatas, mantidas em homogeneizador a 20°C.

Após 30 minutos os vermes foram sedimentados por centrifugação a 7000 rpm durante 3 minutos e lavados 3 vezes em NaCl 85 mM. Os vermes de cada um dos tratamentos foram transferidos para placas de Petri contendo NGM e semeadas com *E. coli* OP50. Logo se contaram os vermes sobreviventes 48 horas após o tratamento. Os resultados serão expressos com porcentagem de vermes sobreviventes em relação ao dia 0 e comparados ao grupo controle (ausência de Mn) (Au et al., 2009, Benedetto et al., 2010, Avila et al., 2012, Bornhorst et al., 2014).

Microscopia de fluorescência

Após o tratamento transferimos 50 vermes, observando nos dias 6, 9 e 12 pós-eclosão e utilizando 10 vermes para cada um dos dias. Os vermes foram anestesiados com 10 µM cloridrato de levamisol e montados em lâminas contendo agarose a 4%. As fotos foram obtidas no microscópio de fluorescência.

Análise estatística:

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey. Os experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

A Figura 1 demonstra que os vermes expressam a poliglutamina humana (AM101) apresentaram menor taxa de mortalidade em relação aos selvagens (N2) quando expostos às mesmas concentrações de Mn (Figura 1). Estes resultados sugerem que a expressão de PolyQ mutante pode estar associada à resistência à toxicidade do Mn, o que já foi observado em outros modelos como em camundongos e culturas de células estriatais (Benedetto et. al., 2010).

Uma vez que a cepa AM101 expressa poliQ marcada com YFP observamos que o Mn induziu maior quantidade de agregados nos neurônios colinérgicos e dopaminérgicos com o passar dos dias (Figura 2).

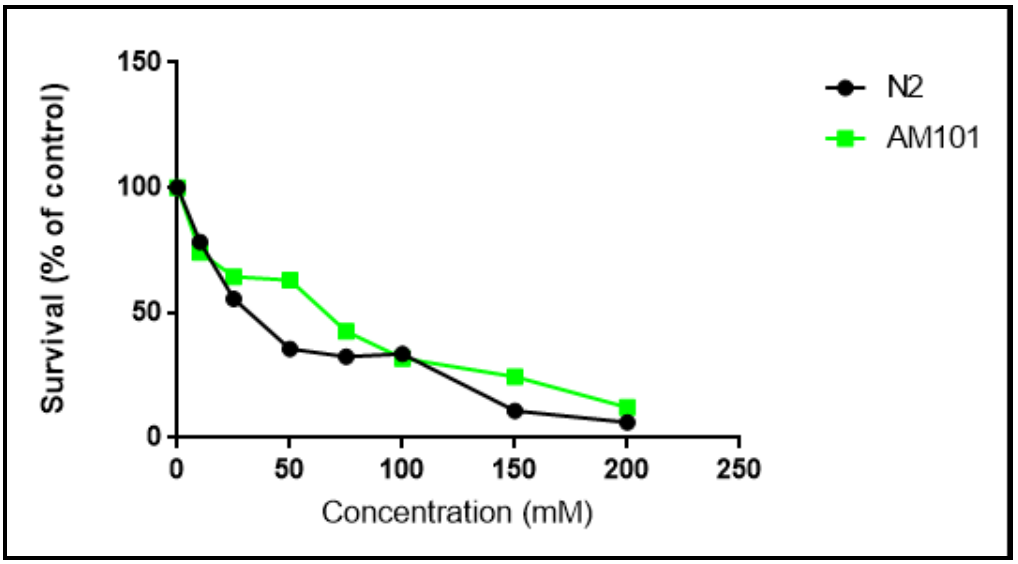


Figura 1: Curva de sobrevivência das cepas N2 e AM101 frente a diferentes concentrações de Mn. Os dados estão apresentados na forma de média ± erro padrão (n=3)

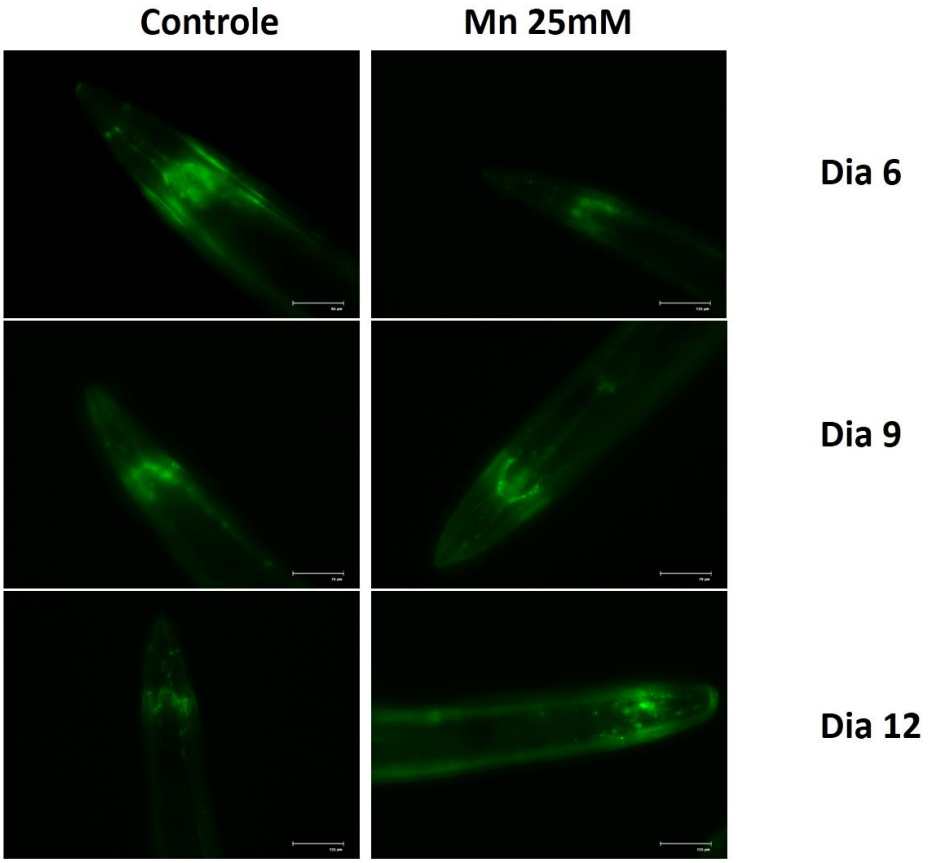


Figura 2: Imagens representativas de animais da cepa AM101 expostos ou não ao Mn nos dias 6, 9 e 12.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os vermes da linhagem selvagem ao serem expostos ao Mn nas mesmas concentrações ao verme que expressa a poliglutamina apresentou uma sobrevivência menor. Sugerindo que os vermes mutantes com Htt possuem uma sensibilidade menor ao Mn.

Como foi relatado anteriormente essa interação neuroprotora foi altamente específica de metal, sugerindo uma relação única entre a toxicidade mutante htt e Mn (Williams, Blairanne B. et al).

Serão necessários mais trabalhos para avaliar os efeitos que o manganês causa na PolyQ, suas conseqüências na HD e se os fatores ambientes encontram-se influenciando ou não.

5. REFERÊNCIAS

Aitlhadj L, Silva de Ávila D, Benedetto A, Aschner M, Stürzenbaum SR, Aitlhadj L, Silva de Ávila D, Benedetto A, Aschner M, Stürzenbaum SR (2011) Environmental exposure, obesity and Parkinson's disease: lessons from fat and old worms. Environ Health Perspect 119:20-28.

A Model Experimental System: Properties of C. elegans [acesso em 23 set 2017] Disponível em:http://wormclassroom.org/short-history-c-elegans-research

Benedetto A, Au C, Avila DS, Milatovic D, Aschner M (2010) Extracellular dopamine potentiates Mn-induced oxidative stress, lifespan reduction, and dopaminergic neurodegeneration in a BLI-3-dependent manner in Caenorhabditis elegans. PLoS Genet 6 (8).Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20865164

Brenner S (1974) The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics 77:71-94.

Caito S, Fretham S, Martinez-Finley E, Chakraborty S, Avila D, Chen P, Aschner M (2012) Genome wide analyses of metal responsive genes in Caenorhabditis elegans. Frontiers in genetics 3.

Disease-toxicant screen reveals a neuroprotective interaction between Huntington's disease and manganese exposure [acesso em 23 set 2017] Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3083829/pdf/nihms288486.pdf

Gidalevitz T, et al., Science. 2006 Mar 10;311(5766):1471-4 [acesso em 23 set 2017] Disponível em: http://www.wormbase.org/species/c_elegans/strain/AM101#02--10

The Nrf2/SKN-1-dependent glutathione S-transferase π homologue GST-1 inhibits dopamine neuron degeneration in a Caenorhabditis elegans model of manganism. [acesso em 23 set 2017] Disponível em:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721876

Post JE. Manganese oxide minerals: crystal structures and economic and environmental significance. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:3447–3454. [acesso

em 23 set 2017] Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC34287/