

Análise dos danos ao DNA nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) portadoras do polimorfismo Ala-9Val do gene SOD2

FEITEN, JACSON G.¹, MOREIRA, JCF²

¹ Autor, Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
² Orientador, Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica ICBS, UFRGS



UFRGS PROPSQ XXV SIC
Salão Iniciação Científica

CS - Ciências da Saúde

INTRODUÇÃO

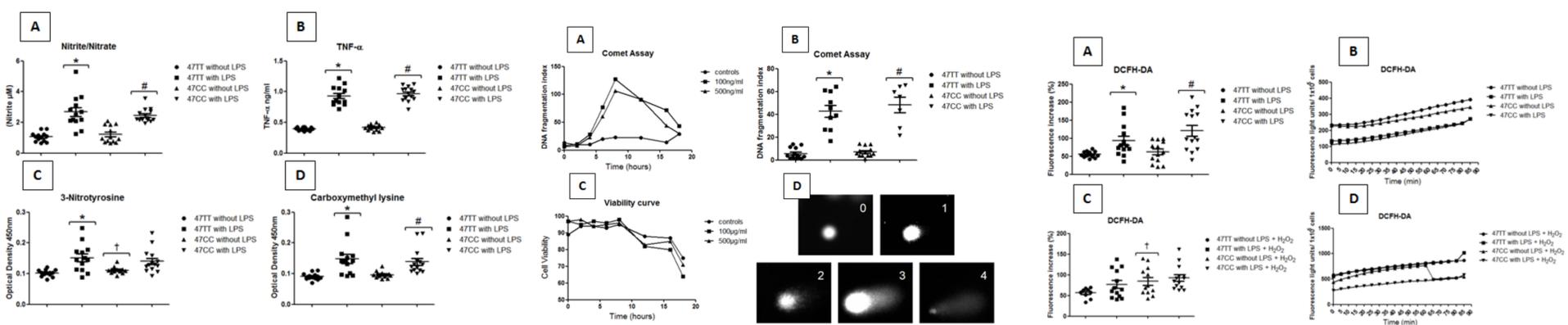
O desfecho da sepse ocorre devido a influência de fatores ambientais e genéticos, cuja expressão de variantes suportam ou não este desfecho. Estresse oxidativo está relacionado com a patogenicidade da sepse, ocorrendo uma superprodução de espécies reativas de oxigênio associados com inflamação. O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de oxidantes intracelulares, bem como analisar os danos ao DNA nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) portadoras do polimorfismo Ala-9Val do gene SOD2 antes e depois de serem desafiadas com lipopolissacárideos (LPS).

MATERIAL E MÉTODOS

As PBMC foram isoladas do sangue de 30 voluntários humanos saudáveis por gradiente de centrifugação (15 voluntários para cada alelo) e os seguintes ensaios foram realizados: produção de nitritos; análises por ELISA para o TNF- α , carboximetil lisina e nitrotirosina; determinação das espécies reativas intracelulares por 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA); ensaio cometa. A análise estatística utilizada foi o teste t Student, com significância $p < 0,05$.

RESULTADOS E CONCLUSÃO

Na técnica de DCFH-DA nas células com LPS, há um aumento na porcentagem de fluorescência em ambos os alelos. Porém a taxa de fluorescência nas células com LPS são menores que sem. Quando adiciona-se H_2O_2 , a taxa de fluorescência nas células com o alelo 47C sem LPS cai (60 min) para os níveis das mesmas células com LPS e, no entanto, isso não acontece nas células com o alelo 47T que apresentam níveis mais elevados. Quando se analisou a porcentagem de fluorescência, é observado que a produção de espécies reativas nas células 47CC sem LPS é maior do que nas células 47TT sem LPS. Os níveis de nitrito foram mais altos nas células desafiadas com LPS quando comparada com o basal (sem LPS) em ambos os alelos, este resultado foi igualmente observado para TNF- α , para carboximetil lisina, mas para 3-nitrotirosina existe diferença entre os alelos no grupo basal (o alelo 47C produz mais 3-nitrotirosina) entre os grupos com e sem LPS houve diferença nas células 47TT. No ensaio cometa não foi encontrada diferença entre os alelos, apenas entre os grupos com e sem LPS. O alelo -9Ala (47C) do polimorfismo Ala-9Val do gene SOD2 humano possui um diferencial em relação ao outro alelo na produção de espécies reativas em células mononucleares de sangue periférico estressadas com peróxido de hidrogênio.



(A) A produção de nitrito (nM) foi medida através do ensaio de Greiss. (B) liberação do TNF- α foi medida por ELISA utilizando proteína purificada. Para analisar as alterações no teor de 3-nitrotirosina (C), e carboximetil método ELISA indireto foi usada lisina (D), a absorbância foi medida a 450 nm. A pontuação de danos no DNA e viabilidade celular em PBMC separados por 47C > T SOD2 SNP com ou sem LPS. (E) Curvas de ensaio cometa e (G) curva de viabilidade celular analisada em diferentes concentrações de LPS (0, 100 e 500ng/ml) para diferentes intervalos de tempo (0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 18 horas). (F) A extensão dos danos ao DNA determinado pelo ensaio cometa em PBMC separados por 47C > T SOD2 SNP desafiados ou não com LPS 100ng/ml por 8 horas. (H) imagens do cometa Representante mostrando diferentes níveis de quebras de DNA na pontuação visual, usando SYBR Seguro (200x). As células são avaliadas e receberam pontuação de 0 (sem quebras observado) a 4 (índice de quebra máxima), de acordo com o tamanho e forma da cauda. Intracelular, produção de espécies reativas pelo ensaio DCFH-DA em PBMC separados por 47C > T SOD2 SNP desafiados ou não com LPS 100ng/ml por 18 horas. Em (I) e (K) o aumento percentual em cada poço foi calculada de acordo com a fórmula $[(F_{t_{90}} - F_{T_0}) / F_{T_0} \times 100]$, onde $F_{t_{90}}$ = fluorescência em tempo de 90 minutos e F_{T_0} = fluorescência ao tempo 0 min. Em (J) e os valores de (L) são expressos como unidades de luz de fluorescência / 1×10^5 células. Em (K) e (L) H_2O_2 100 μ M foi adicionado nas células, no tempo zero. * $p < 0,01$ valor descreve uma comparação entre as células 47TT sem LPS e com LPS, # $p < 0,01$ valor descreve uma comparação entre as células 47CC, sem LPS e com LPS; † $p < 0,05$ descreve uma comparação entre o genótipo 47CC e 47TT sem LPS (o teste t de Student foi realizado).