



ESTUDO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO Á 2,3-BUTANODIONA NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO TECIDO HEPÁTICO.

Taiana Trindade Sena¹,
Leiliane dos Santos da Conceição¹,
Cleber Nunes Barreto²,
Sheila Barreto Guterres³,
Nilson Antonio de Assunção⁴,
Letícia Dias Lima Jedlicka⁵

1. INTRODUÇÃO

A 2,3-butanodiona é um composto orgânico (1) que além da nomenclatura oficial (IUPAC), também apresenta outros nomes como diacetil, biacetil, dimetildicetona, 2,3-dicetobutano e dimetilglioxal. Esta substância é amplamente utilizada na indústria de alimentos por conferir aroma e sabor amanteigado aos alimentos como, por exemplo, pipoca de micro-ondas, manteiga, bolos, biscoitos, vinhos, café whisky entre outros. (2-4) Também é adicionada em cigarros convencionais (5), e em cigarros eletrônicos. (6)

No decorrer da última década surgiram algumas evidências de que a exposição a este aromatizante possa ser prejudicial à saúde levando ao desenvolvimento de doenças pulmonares. (7) Os primeiros casos foram observados em trabalhadores de uma fábrica de pipoca de micro-ondas nos EUA, estes trabalhadores desenvolveram uma doença pulmonar rara, a bronquiolite obliterante. (8) No Brasil trabalhadores de uma fábrica de biscoitos amanteigados também desenvolveram a mesma doença. (5) A bronquiolite obliterante obstrui parcialmente ou totalmente dos brônquios e bronquíolos devido à fibrose; os sintomas são tosse persistente, dispnéia sibilos, cianose e insuficiência respiratória. (8-9) Estes casos supracitados foram relacionado com a inalação dos vapores amanteigados ricos em 2,3-butanodiona, pois os aromatizantes químicos são produtos que possuem alta volatilidade, desta forma são facilmente inalados quando ocorre a evaporação dos mesmos.(5) Também existem registros de trabalhadores que morreram devido à exposição de 2,3-butanodiona, sendo que o primeiro óbito ocorreu no final da década de 80. (10).

O objetivo deste trabalho foi analisar a diferença na expressão hepática de proteínas em animais expostos á 2,3-butanediona, a fim de compreendermos se esta substância também é capaz de causar alterações neste órgão. A análise do tecido hepático é grande valia, pois o fígado é reponsável por reações de biotransformação e metabolismo de xenobióticos incluindo o diacetil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os animais foram divididos em 2 grupos com seis animais cada: A) controles e B) tratados com diacetil. O mesmo foi administrado por gavagem oral, diariamente, por trinta dias, na concentração de 540 mg/kg/dia. O fígado foi coletado e congelando imediatamente em nitrogênio líquido. Todo o material foi estocado à -80 oC. Os tecidos (do fígado), congelados foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um material fino e fragmentado. Esse material foi liofilizado e utilizado para as análises. Foi realizada a extração de proteínas que foram quantificadas pelo método de Bradford. Uma alíquota de 250 µg de proteínas foram digeridas com tripsina e endoproteínase LysC. Após a digestão as amostras foram submetidas à remoção

¹ Graduandas do Curso de Saúde Coletiva, da Faculdade de Ciências da Saúde e Biológicas, Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, e-mail:senataiana@unifesspa.edu.br

² Graduando do Curso de Bacharelado em Farmácia (UNIFESP). Pesquisadora Projeto de Pesquisa :” Exposição ao flavorizante Diacetil: Estudo da acetilação de Proteínas Via Radicalar Empregando Ferramentas Bioanalíticas”. E-mail: nunes.barreto@hotmail.com

³ Doutora em Ciências: Química Analítica pela USP. Professora Adjunta da Universidade Federal de Rondônia (Dep. de Química). Coordenadora do Projeto de Pesquisa: Exposição ao flavorizante Diacetil: Estudo da acetilação de Proteínas Via Radicalar Empregando Ferramentas Bioanalíticas. E-mail: sheilaguterres@gmail.com

⁴ Doutor em Ciências: Química Analítica pela USP. Professor Associado da Universidade Federal de São Paulo (Dep. De Ciências Exatas e da Terra/UNIFESP). Coordenador Externo do Projeto de Pesquisa:” Exposição ao flavorizante Diacetil: Estudo da acetilação de Proteínas Via Radicalar Empregando Ferramentas Bioanalíticas”. E-mail: nilson.assuncao@unifesp.edu.br

⁵ Doutora em Ciências: Medicina Translacional pela UNIFESP. Professora Adjunta da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (FACISB/IESB/Unifesspa). Coordenadora do Projeto de Pesquisa: Exposição ao flavorizante Diacetil: Estudo da acetilação de Proteínas Via Radicalar Empregando Ferramentas Bioanalíticas. E-mail: leticia.dias@unifesspa.edu.br

de detergentes utilizando colunas para remoção de detergentes (Pierce, # 87776).

Foram aliqüotados 5ul da amostra digerida que foi analisada em um Nano HPLC acoplado ao espectrômetro de massas do tipo Q-TOF (quadrupolo-time of flight). No NanoHPLC foi utilizada uma coluna de fase reversa (C18) de 0,1 mm, foram utilizadas as seguintes fases móveis: (A) Acido Fórmico/ H₂O (1:1000), (B) Acido Fórmico/ACN/H₂O (1:950:50) e (C) Fórmico/ACN/H₂O (1:20:980) em um gradiente de eluição de 2 a 50% em 150 minutos de processamento, taxa de fluxo foi ajustada para 0,500 µL/min.

Os dados de espectrometria de massas foram processados usando o software Compass 1.7 para OTOF (Bruker Daltonics, EUA) e deconvoluídos para gerar um arquivo compatível com o banco de dados Mascot. Este arquivo foi analisado utilizando o programa Protein Scape (Bruker Daltonics, EUA), A taxonomia empregada foi *Rattus norvegicus* e as enzimas utilizadas foram tripsina e endoproteínase LysC, permitindo a busca com até uma clivagem perdida. A modificação fixa aplicadas foi carbamidometilação de cisteína, e as modificações variáveis foram oxidação de metionina e acetilação de lisina, histidina e arginina. Para as análises de identificação das proteínas, foi utilizado o score mínimo de 35 ($p < 0,05$).

As proteínas acetiladas foram submetidas à análise de ontologia dos genes (GO), utilizando a base de dados Panther db (<http://pantherdb.org/>). Essa análise foi realizada para determinar as funções bioquímicas das proteínas-alvo, identificadas nos fígados dos animais do grupo tratado, utilizando as identificações de acesso do UniProt (<http://www.uniprot.org>) e para *Rattus norvegicus*. Essa base de dados foi escolhida como o banco de dados de referência para as análises de processo biológico, classe das proteínas e função molecular.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir das análises foram encontradas proteínas diferencialmente expressas entre os grupos controle e tratados com 540 mg/Kg/dia de diacetil, sendo que 34 das proteínas encontradas foram exclusivas dos animais tratados com diacetil. Foram pesquisadas as características destas 34 proteínas a fim de compreender as implicações da exposição ao diacetil. Foram analisadas suas funções e associações a possíveis doenças, devido o surgimento de algumas e o aumento das atividades das mesmas. Algumas proteínas catalizadoras foram encontradas suas funções são facilitar as reações e diminuir a energia que estimula os reagentes, algumas de suas classificações aparecem como, As Hidrolases; Isomerases; Ligases e Oxidredutases, o aumento das atividades das mesmas estão associados a doenças do sistema linfático, estomatite, anemia hemolítica, anemia macrocítica, doença pulmonar obstrutiva crônica e diabetes mellitus. (11,12)

Outras proteínas encontradas foram as Histonas H2AY; H33 e H4, estas proteínas desempenham um papel central na regulação da reprodução, no reparo do DNA, na replicação do DNA e na estabilidade cromossômica. As demais proteínas tem funções na regulação celular, controle da proliferação celular e do envelhecimento, tem vínculo ATP, trabalham no citoesqueleto da célula, reguladoras hormonais, ligações covalentes a outras proteínas, regulam a expressão dos genes alvo, foram RDH2; PUB1; K1C18; SPA3K; DLHD; VINC; AK1A1; NUP85; PROFILIN-1; HS90B; RL40; PON3; CYB5B; GRP75; PEBP1; NADC. Estas proteínas estão relacionadas á doenças como, epilepsia, doença de Alzheimer; bronquite, câncer de laringe.(11,12) As principais funções destas proteínas estão representadas no gráfico 1.

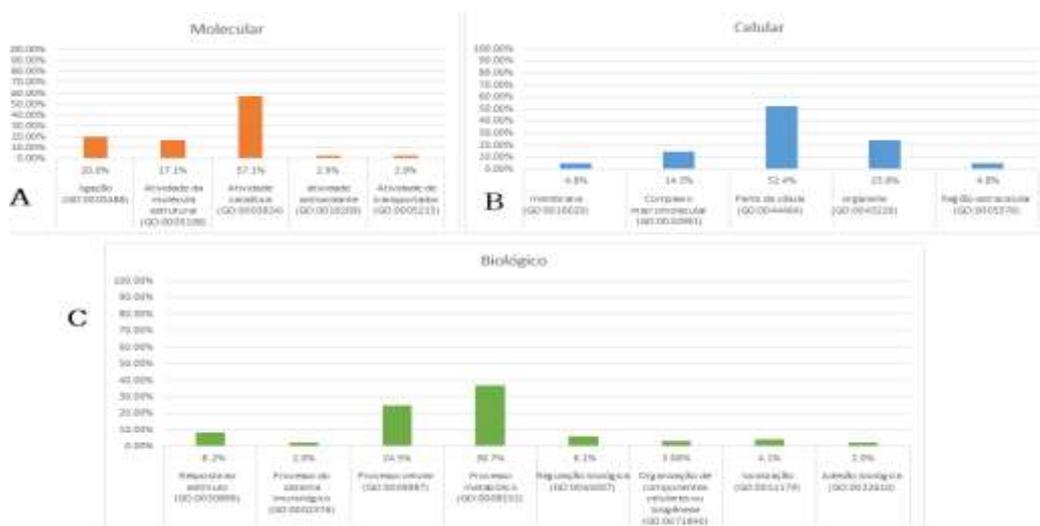


Gráfico 1: Funções das proteínas expressas exclusivamente no tecido hepático dos animais tratados com diacetil em comparação ao grupo controle. A) Função Molecular. B) Localização subcelular. C) Função Biológica

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Diacetil está presente em vários alimentos sem contar que trabalhadores que trabalham nas indústrias alimentícias que utilizam este flavorizante, estão mais expostos. Tanto a sua ingestão como o contato/exposição com o mesmo leva a alterações nas células e principalmente nas proteínas que as regulam, levando assim o surgimento de umas e o aumento da atividade de outras. Levando assim, a irregularidades nas codificações e manutenção, o que pode estar associado a uma maior disposição para o desenvolvimento de cânceres, insuficiências hepáticas, doenças pulmonares e diabetes.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Universidade Federal dos Sul e Sudeste do Pará (UNIFESSPA), a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

REFERENCIAS

Solomons TWG, Fryhle CB. Química Orgânica,. 6 ed. Aparecida, SP: LTC; 2009. 645 p.

Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.

Lovric J. Proteomics from concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis. First ed. Hoboken, USA: Wiley-Blackwell; 2011. 283 p.

Gross JH. Mass spectrometry: a textbook. First ed. Heidelberg, Germany: Springer Verlag 2004. 518 p.

Fujioka K, Shibamoto T. Determination Of Toxic Carbonyl Compounds In Cigarette Smoke. *Environ Toxicol*. 2006;21(1):47-54.

Pierce JS, Abelman A, Spicer LJ, Adams RE, Finley BL. Diacetyl And 2,3-Pentanedione Exposures Associated With Cigarette

Sabah G, Nassima MS, Hafida M, Fayçal S, Baya G, Abderrahim MT, et al. LOW SOD activity is associated with overproduction of peroxynitrite and nitric oxide in patients with acute coronary syndrome. *Nitric Oxide*. 2015.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite - implications for endothelial injury from nitric-oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(4):1620-4.

Cavalcanti Zdr, Leite de Albuquerque Filho AP, de Castro Pereira CA, Aparecida Martins Coletta EN. Bronchiolitis associated with exposure to artificial butter flavoring in workers at a cookie factory in Brazil. *Jornal Brasileiro De Pneumologia*. 2012;38(3):395-9.

Egilman D, Mailloux C, Valentin C. Popcorn-Worker Lung Caused by Corporate and Regulatory Negligence: an Avoidable Tragedy. *Int J Occup Environ Health*. 2007;13(1):85-98

<http://www.genecards.org> [acessado2017ago13]

<http://www.uniprot.org> [acessado2017ago13]