

VARIABILIDADE GENÔMICA

Prof^a. Dra. Maria Aparecida Fernandez
Dra. Roxelle Ethienne Ferreira Munhoz
Dra. Thaís Souto Bignotto

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com os avanços na área da genética e biologia molecular, principalmente com o advento da tecnologia do DNA recombinante, da reação em cadeia da polimerase (PCR) e do sequenciamento automático do DNA, foram desenvolvidas poderosas técnicas para o desenvolvimento de diferentes tipos de marcadores genéticos moleculares.

O elevado número de artigos científicos que utilizam tais marcadores no estudo de várias espécies e com as mais variadas aplicações evidencia o impacto dessa tecnologia na pesquisa científica e tecnológica. Marcadores moleculares podem ser definidos como marcadores genéticos baseados na detecção de isoenzimas ou sequências de DNA. Neste mini-curso abordaremos o uso de marcadores baseados em sequências de DNA para o estudo de variabilidade genética em populações.

Variabilidade genética

A variabilidade genética mede a tendência dos diferentes alelos de um mesmo gene variarem entre si, numa dada população (Primack, 2006). Esta não deve ser confundida com diversidade genética, que é a quantidade total de variações genéticas observada tanto entre as populações de uma espécie, como entre os indivíduos de uma população.

A capacidade de uma população para se adaptar a um ambiente em mudança depende da variabilidade genética. Indivíduos com certos alelos ou combinações de alelos podem ter precisamente as características necessárias para sobreviverem e se reproduzirem sob novas condições. Dentro de uma população, a frequência de um dado alelo pode variar entre raro e muito raro. Estes novos alelos surgem na população tanto através de mutações aleatórias, como pela migração de indivíduos provenientes de outras populações.

A variabilidade genética de uma população é diferente da variação fenotípica deste. Entende-se como fenótipo, o resultado da interação do genótipo, isto é, da constituição genética, com o ambiente. Para o estudo da variabilidade genética de populações é desejável fazê-lo por meio de marcadores moleculares considerados neutros em relação aos efeitos fenotípicos, com efeito epistático e pleiotrópico mínimo ou nulo.

Marcadores de DNA

O princípio da utilização dos marcadores de DNA é baseado no dogma central da biologia molecular e na pressuposição de que diferenças genéticas no DNA significam, na maioria das vezes, diferenças nas proteínas codificadas, as quais em conjunto levam a diferenças no fenótipo (Fig. 1).

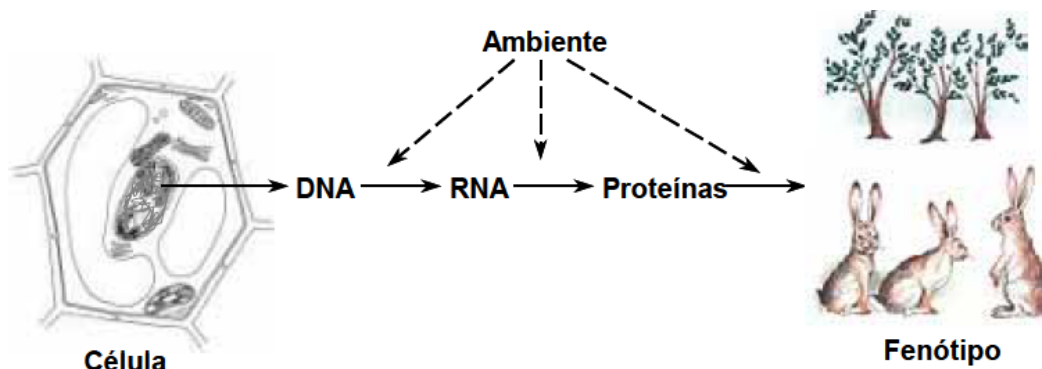


Fig. 1. Dogma Central da biologia molecular, evidenciando a influência direta do DNA no fenótipo.

A idéia de que os cromossomos contêm as unidades informacionais transferidas de uma geração para a outra foi proposta ainda no século XIX. Entretanto, a identificação e descrição do DNA como a molécula que contém esta informação só ocorreu na primeira metade do século XX. Cada cromossomo contém uma longa e única molécula de DNA, além de proteínas que atuam no empacotamento desta molécula. As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados **“marcadores moleculares”**.

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondentemente a regiões expressas ou não do genoma). Marcadores isoenzimáticos são muitas vezes chamados de marcadores bioquímicos. A sequência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas e, em geral, são desconhecidas. Ao se verificar o seu comportamento de acordo com as leis básicas de herança de Mendel, um marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético. Isto é feito, por exemplo, através do estudo do comportamento do marcador em uma população segregante. Portanto, é importante enfatizar que o simples fato do marcador ser DNA, ou produto da transcrição e tradução de uma sequência de DNA, não implica em que se constitua em um marcador “genético”, como frequentemente se supõe (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Um loco molecular que apresenta segregação mendeliana é considerado um marcador genético. Por isso, os marcadores de DNA se prestam para estudos de genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética.

Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para detecção de variabilidade genética ao nível de sequência de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de variabilidade genética como na prática de melhoramento genético e diagnóstico molecular.

Polimorfismo genético é, por definição, uma variação genotípica que pode ser separada em classes distintas e bem definidas. O controle genético se dá por um ou poucos loci, sendo a característica pouco suscetível a fatores ambientais.

O desenvolvimento tecnológico na área de marcadores moleculares tem sido fascinante e extremamente rápido. A tecnologia de DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA via PCR (“Polymerase Chain Reaction”, ou reação de polimerase em cadeia), abriram o caminho para uma mudança no paradigma genético básico: da inferência do genótipo a partir do fenótipo, onde Mendel foi pioneiro para a análise direta da variação na sequência de DNA. Esta mudança de enfoque foi denominada transição da “genética Mendeliana” para a “genética genômica” (Beckmann, 1988). Tecnologias de análise molecular mais acessíveis e eficientes estão constantemente sendo aprimoradas. Métodos estatísticos acompanham este desenvolvimento, e têm permitido a manipulação de enormes quantidades de dados.

Enfim, os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Botstein *et al.*, 1980) e minissatélites ou locos VNTR (Variable Number of Tandem Repeats; Jeffreys *et al.*, 1985). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Williams *et al.*, 1990); SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions); STS (Sequence Tagged Sites) (Paran & Michelmore, 1993); Microsatélite (Litt & Luty, 1989); e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Vos *et al.*, 1995).

Podemos ainda classificar os marcadores moleculares de acordo com a sua base genética, sendo que o marcador é codominante quando os cromossomos homólogos podem revelar fragmentos de um mesmo tamanho (genótipo homozigótico) ou não (genótipo heterozigótico) devido a variações nos sítios de restrição. Já no caso de marcadores dominantes, não é possível saber se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, considerada homozigótica para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado.

Entre as vantagens dos marcadores moleculares, podemos citar a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos; a identificação direta do genótipo sem influência do ambiente; a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta ou do animal ou a partir de cultura de células ou tecidos e a possibilidade de gerar maior quantidade de informação genética por loco no caso de marcadores co-dominantes. Os diferentes tipos de marcadores moleculares têm permitido estudos de evolução, de diversidade genética inter e intraespecífica, de identidade, origem genética e identificação de novos variantes, gerando informações importantes para subsidiar diferentes ações de pesquisa, principalmente relacionadas a programas de conservação, caracterização e uso de recursos genéticos e programas de melhoramento animal e vegetal.

PCR - Polymerase Chain Reaction ou Reação da Polimerase em Cadeia

A tecnologia da PCR foi concebida em meados da década de 80 (Mullis e Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985). Desde então esta tecnologia causou uma revolução na biologia, na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais como nas áreas de melhoramento genético de plantas e animais domésticos, uma vez que esta técnica possibilitou a geração de grandes quantidades de DNA de segmentos específicos, podendo ser facilmente detectado a olho nu em gel de eletroforese através de corantes específicos.

PCR é uma técnica poderosa, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Sua reação baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como indicadores (*primers*) que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo da amplificação, que acontece num Termociclador em microtubos (Fig. 2).



Fig. 2. Termociclador.

Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada através da elevação da temperatura para 92°C a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35°C a 60°C, dependendo do tamanho e sequência do *primer* utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada *primer* com as sequências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência-alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes (Fig. 3). Uma vez que a quantidade de DNA da sequência alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de sequência alvo (Fig. 4). Esta escala de amplificação permite iniciar com quantidades mínimas de DNA (da ordem de picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma sequência específica de interesse.

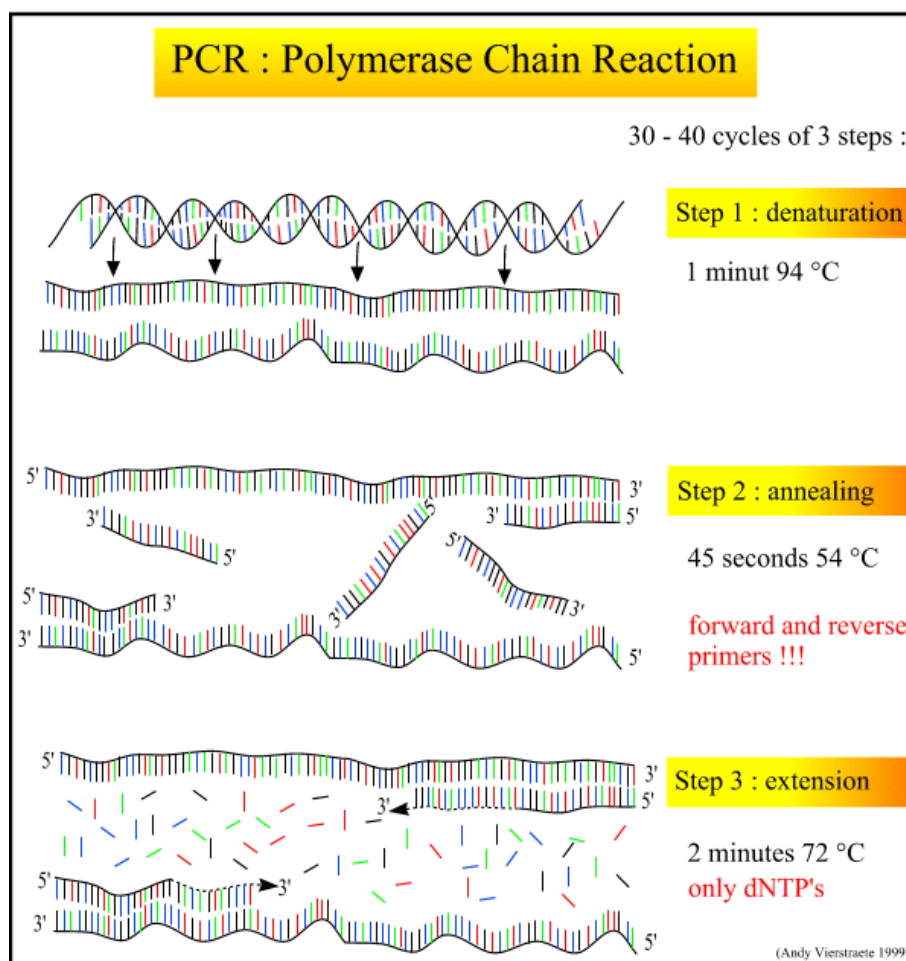


Fig. 3. Diferentes passos de uma reação de polimerase em cadeia (PCR).

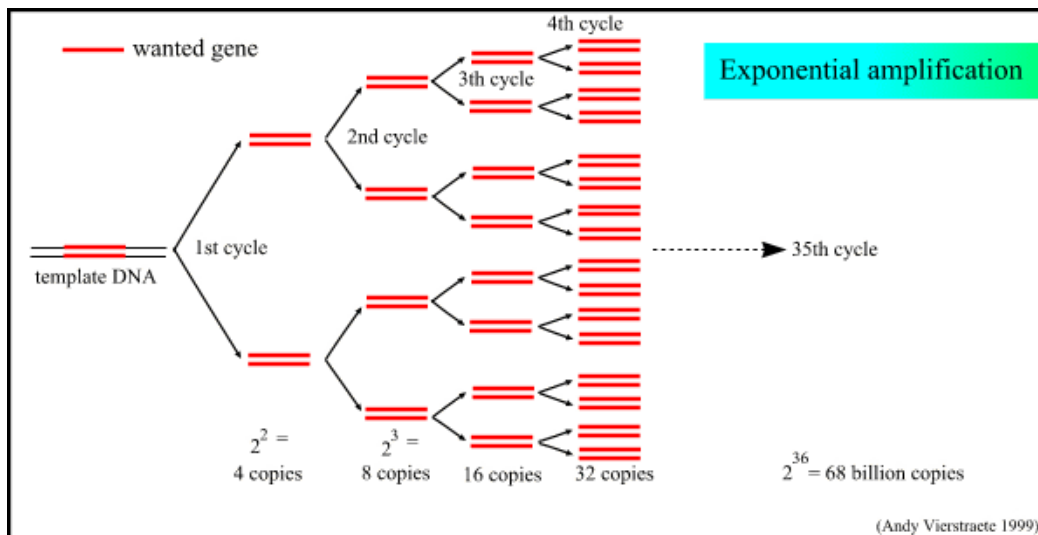


Fig. 4. Amplificação exponencial de um gene numa reação de polimerase em cadeia (PCR).

Porém, a construção de *primers* para amplificação via PCR depende do conhecimento prévio das sequências de nucleotídeos que flanqueiam a sequência de DNA de interesse. Para conhecer estas sequências é necessária a clonagem e sequenciamento da região. Em vista disso, com exceção de alguns genes de sequência conhecida, a PCR apresentou de início, um uso limitado como técnica para a obtenção de marcadores moleculares.

Inter Simple Sequence Repeat – ISSR

Marcadores moleculares do tipo ISSR são amplificados por PCR usando sequências de microssatélites como *primers*. ISSRs são fragmentos de DNA localizados entre regiões de microssatélites adjacentes e orientados em posições opostas. Os microssatélites (ou Sequências Simples Repetidas, “SSR – *Simple Sequence Repeats*”) consistem de pequenas sequências com 1 a 4 nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem (Exemplo de um microssatélite: CACACACACACA).

A técnica foi criada por Zietkiewicz et al. (1994) e se baseia na amplificação de regiões que intercalam dois blocos de **microssatélites**. Portanto, ISSR pode ser interpretado como um mapeamento de microssatélites do genoma do organismo estudado. As maiores áreas de aplicação da metodologia ISSR incluem DNA fingerprinting, análises filogenéticas e de diversidade genética, construção de mapas genômicos, seleção assistida por marcadores, estudos de populações naturais e especiação.

Base genética dos marcadores ISSR: ISSR é um método baseado em PCR e que envolve amplificações de segmentos de DNA presente a uma distância amplificável entre duas regiões repetidas de microssatélites idênticas orientadas em direções opostas. A técnica utiliza

microssatélites, geralmente de 16 a 25 pares de bases de comprimento, como *primers* numa única reação de PCR. Esses *primers* amplificam vários locos genômicos, principalmente sequências localizadas entre SSR de diferentes tamanhos. As sequências de microssatélites usadas como *primers* podem ser di-nucleotídeos, tri-nucleotídeos, tetra-nucleotídeos ou penta-nucleotídeos. Os *primers* podem ainda ser ancorados ou não, no entanto é mais comum o uso de *primers* ancorados nas extremidades 3' ou 5' com 1 a 4 bases degeneradas (Fig. 5).

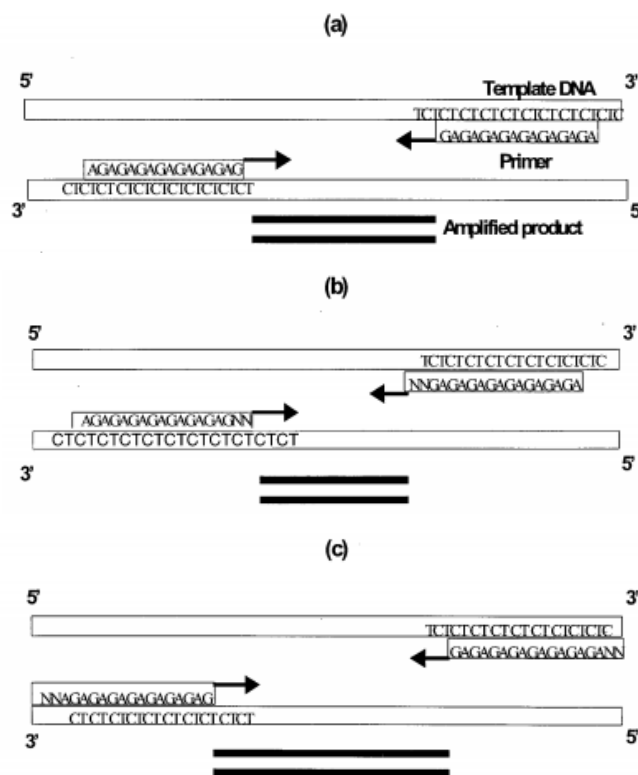


Fig. 5. ISSR: Representação esquemática de um *primer* (AG)₈ não ancorado (a), ancorado na extremidade 3' (b) e ancorado na extremidade 5' (c) que se anela em uma repetição do tipo (TC)_n para amplificar segmentos entre regiões SSR flanqueadas por duas sequências (TC)_n orientadas inversamente.

As amplificações não requerem informação da sequência do genoma e conduz a multilocos e altos padrões polimórficos. A fonte de variabilidade nos ISSRs pode ser atribuída a alguns fatores, como os listados a seguir:

(a) Amostra de DNA

Mutações no sítio de anelamento do *primer* podem impedir amplificações de fragmentos e, portanto, indicar presença/ausência de polimorfismo. Eventos de inserção ou deleção dentro da região SSR ou da região amplificada resultam na ausência de um produto ou polimorfismo de comprimento.

(b) Primer utilizado

A extensão do polimorfismo também varia com a natureza (*primer* não ancorado, ancorado na extremidade 3' ou 5') e com a sequência de repetições (motivos) do *primer* utilizado. Quando o *primer* não é ancorado (Fig. 5a), ou seja, apenas a região do microssatélite é usada como *primer*, o *primer* tende a deslizar dentro das unidades de repetição durante a amplificação.

Quando se ancora o *primer* com 1 a 4 nucleotídeos degenerados na extremidade 3' (Fig. 5b) ou na extremidade 5' (Fig. 5c), pode-se assegurar o anelamento do *primer* apenas no final do microssatélite. Quando *primers* ancorados na extremidade 5' são usados, os produtos amplificados incluem tanto a sequência de microssatélite quanto suas variações no comprimento em pares de base ao longo do genoma e, portanto, fornecem maior número de bandas e maior grau de polimorfismo.

Como os *primers* possuem motivos de SSR, a frequência e a distribuição de motivos repetitivos de microssatélites em diferentes espécies também influenciam a geração de bandas. Em geral, *primers* com repetição (AG), (GA), (CT), (TC), (AC) e (CA) apresentam maior polimorfismo do que *primers* com outras repetições di-, tri- ou tetra-nucleotídicas.

(c) Método de detecção

O nível de polimorfismo detectado tem mostrado variar dependendo do método de detecção empregado. Eletroforese em gel de poliacrilamida em combinação com radioatividade (reação de PCR com nucleotídeos marcados) tem demonstrado ser o método mais sensível, seguido por eletroforese em gel de poliacrilamida com coloração de prata e gel de agarose corado com brometo de etídeo.

Vantagens e limitações dos marcadores ISSR:

ISSR é uma técnica simples, rápida e eficiente. O uso de radioatividade não é essencial. Os *primers* não são registrados e podem ser sintetizados por qualquer pessoa. Variações no tamanho, motivo e ancoramento dos *primers* são possíveis. Os *primers* são longos (16 a 25 pb), resultando em alta estringência. Os produtos amplificados (marcadores ISSR) são geralmente de 200-2000 pb de comprimento e apresentam alta reprodutibilidade possivelmente devido ao uso de *primers* longos na qual permite um subsequente uso de alta temperatura de anelamento (45 a 60°C). Além disso, é uma técnica que não necessita de informação prévia do genoma do organismo a ser estudado e é altamente polimórfica.

Uma das desvantagens dos ISSRs é que eles segregam predominantemente como marcadores dominantes seguindo herança Mendeliana simples (Gupta et al., 1994). No entanto, também tem sido mostrado que eles segregam como marcadores co-dominantes em alguns casos (Sankar e Moore, 2001). Pode também, ter problemas de reprodutibilidade.

Determinação da sequência do DNA

Sequenciamento de fragmentos de genes permite a avaliação direta de polimorfismos de DNA, fornecendo o melhor tipo de dado para inferências filogenéticas e determinação de relações de parentesco entre indivíduos e populações. Diferentes segmentos de DNA mitocondrial e nuclear evoluem a taxas diferentes. Regiões de evolução rápida são adequadas para o estudo de organismos proximamente relacionados, enquanto regiões mais conservadas são mais apropriadas para a comparação entre táxons mais divergentes.

Basicamente, dois métodos têm sido utilizados para determinar a sequência de nucleotídeos de DNA: 1) o método de degradação química de DNA, desenvolvido por Maxam e Gilbert e 2) o método enzimático de Sanger ou de terminação da cadeia com dideoxirribonucleosídeo trifosfato. Embora o primeiro método tenha tido ampla aplicação inicialmente, o segundo tem sido o mais utilizado atualmente.

Ambos os procedimentos de sequenciamento de DNA dependem da produção de uma população de fragmentos de DNA que tenham uma ponta em comum (todos começam exatamente no mesmo nucleotídeo) e terminem em todas as posições possíveis (cada nucleotídeo consecutivo) na outra ponta. Esses fragmentos são então separados com base no tamanho por eletroforese em gel. Nos dois casos, quatro reações bioquímicas separadas são feitas simultaneamente, cada uma gerando um conjunto de fragmentos que terminam em uma das quatro bases (A, G, C ou T) no DNA.

Método de Maxam e Gilbert ou Método Químico

Criado por Allan Maxam e Walter Gilbert, esse método envolve a degradação química do DNA, marcado em uma extremidade, de forma que uma população de fragmentos é gerada e analisada em gel de poliacrilamida.

As pontas 5' do DNA são marcadas com ^{32}P , o DNA é clivado, os fragmentos são isolados pelo tamanho, e então o duplex de DNA é separado, com um filamento específico sendo descartado, para produzir uma população de filamentos idênticos marcados em uma ponta. A mistura é então dividida em quatro amostras, sendo cada uma delas submetida a um reagente químico diferente que destrói uma ou duas bases específicas. Os quatro reagentes destroem (1) só G, (2) A e G, (3) T e C, ou (4) apenas C. A perda de uma base torna a sequência açúcar-fosfato da cadeia de DNA mais sensível a quebrar nesse ponto. As condições dos tratamentos químicos para modificações das bases e clivagem são feitas das seguintes formas:

(1) Para G, um tratamento com dimetil sulfato metila o nitrogênio 7 da guanina, que se abre entre os carbonos 8 e 9. Um tratamento com piperidina remove a base modificada;

(2) Para G+A, um tratamento com ácido fórmico enfraquece as ligações glicosídicas. Protonando os nitrogênios dos anéis de purina. Esses são, então, removidos com piperidina;

(3) Para T+C, um tratamento com hidrazina cliva os anéis de timina e citosina. Um tratamento com piperidina remove as bases modificadas;

(4) Para C, hidrazina, na presença de NaCl, faz com que só a citosina seja modificada e possa ser deslocada por tratamento com piperidina

A concentração do reagente é ajustada, de modo que apenas cerca de 1 em 50 bases-alvo são destruídas. Isso significa que dentro de uma determinada amostra em alguns filamentos apenas um nucleotídeo será destruído. Para tais filamentos, os comprimentos dos fragmentos serão determinados pela distância da ponta 5' marcada até o nucleotídeo em particular que foi perdido na sequência. Como este é um evento aleatório em cada um dos agentes destruidores de base, cada ocorrência dessa base em particular irá produzir um fragmento marcado de tamanho distinto. Quando esses pedaços são separados em colunas diferentes de um gel de poliácridamida, de acordo com o tipo de reagente no qual estavam, eles são dispostos por ordem de comprimento, e a base destruída em cada sítio pode ser determinada notando-se em que coluna(s) a banda aparece. Portanto, a sequência de bases no filamento pode ser lida com facilidade pelo padrão de bandas no gel (Fig. 6).

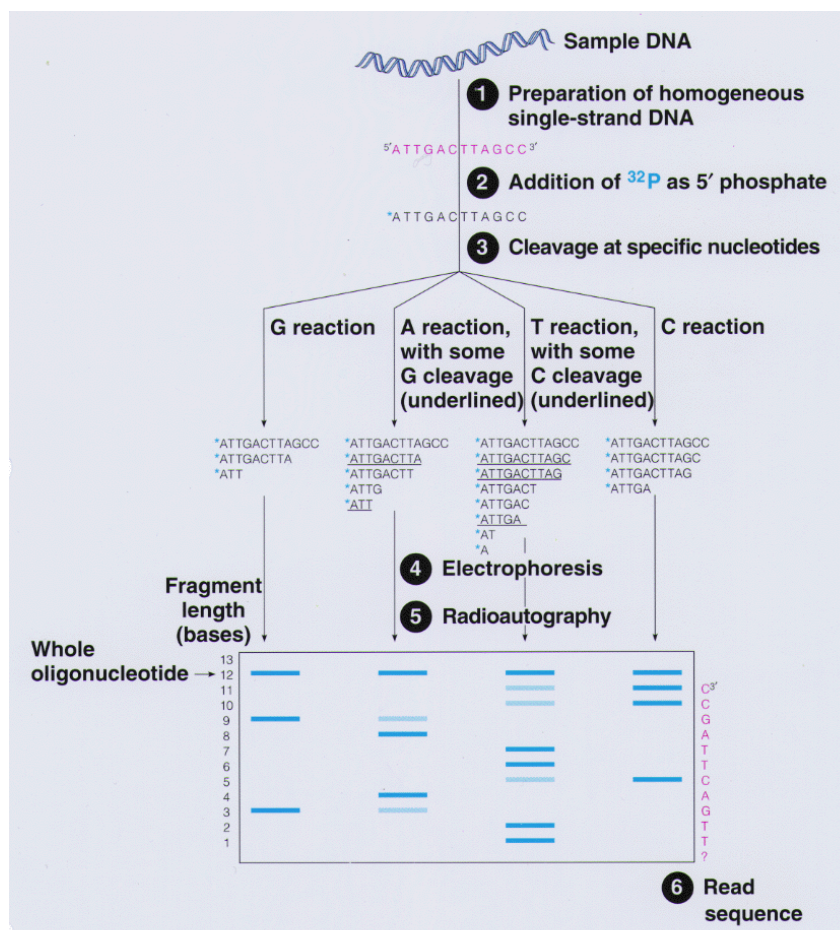


Fig. 6. Sequenciamento pelo método de Maxam-Gilbert.

Método de Sanger ou Método Enzimático

O método de seqüenciamento mais usado hoje em dia foi desenvolvido por Fred Sanger, e utiliza a síntese de DNA *in vitro* na presença de nucleotídeos radioativos e finalizadores específicos de cadeia para gerar quatro populações de fragmentos marcados radioativamente que terminam em As, Gs, Cs e Ts. Os finalizadores de cadeia mais frequentemente usados no procedimento de seqüenciamento são os **didesoxirribonucleosídeo trifosfatos** (ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP). Os didesoxirribonucleosídeo trifosfatos não apresentam a hidroxila no carbono 3' (Fig. 4). Os respectivos trifosfatos de nucleotídeos de didesoxi (ddNTPs) podem ser incorporados a uma cadeia em crescimento, mas terminam a síntese, pois não tem a 3'-hidroxila necessária para se ligar ao trifosfato do nucleotídeo seguinte. Lembre-se que as DNA polimerases necessitam de uma ponta 3'-OH livre para fazer o alongamento da nova fita de DNA. Se um didesoxirribonucleotídeo é adicionado à extremidade de uma cadeia, ele irá bloquear a extensão desta cadeia devido à falta de 3'-OH. Usando ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP como finalizadores de cadeia em quatro reações separadas de síntese de DNA, podem ser geradas quatro populações de fragmentos, e cada população conterá cadeias que terminam na mesma base (A, G, C ou T)

Em uma reação, a proporção de dNTP:ddNTP é mantida em aproximadamente 100:1. Em qualquer um dos tubos, serão produzidos vários comprimentos de cadeia, cada um correspondendo ao ponto no qual o ddNTP respectivo do tubo foi incorporado, terminando o crescimento da cadeia.

O DNA a ser seqüenciado é hibridizado com um *primer*. A fita complementar é sintetizada na presença dos quatro desoxirribonucleosídeos normais (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), mais um único tipo de didesoxirribonucleosídeo (ddATP, ddGTP, ddCTP ou ddTTP), o qual não possui a 3'-hidroxila, e de DNA polimerase. A nova fita de DNA sintetizada é marcada radioativamente ou por marcação da extremidade do *primer* ou por incorporação de um desoxirribonucleosídeo marcado durante a síntese. Quatro reações separadas são feitas, uma para cada didesoxirribonucleosídeo trifosfato.

Após os fragmentos de DNA gerados nas quatro reações paralelas serem liberados dos filamentos-molde por desnaturação na presença de formamida, eles podem ser separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e suas posições no gel podem ser detectadas por autoradiografia. Lendo a escada produzida pela auto-radiografia dos géis de poliacrilamida, pode-se determinar a seqüência completa de nucleotídeos de uma cadeia de DNA (Fig. 7).

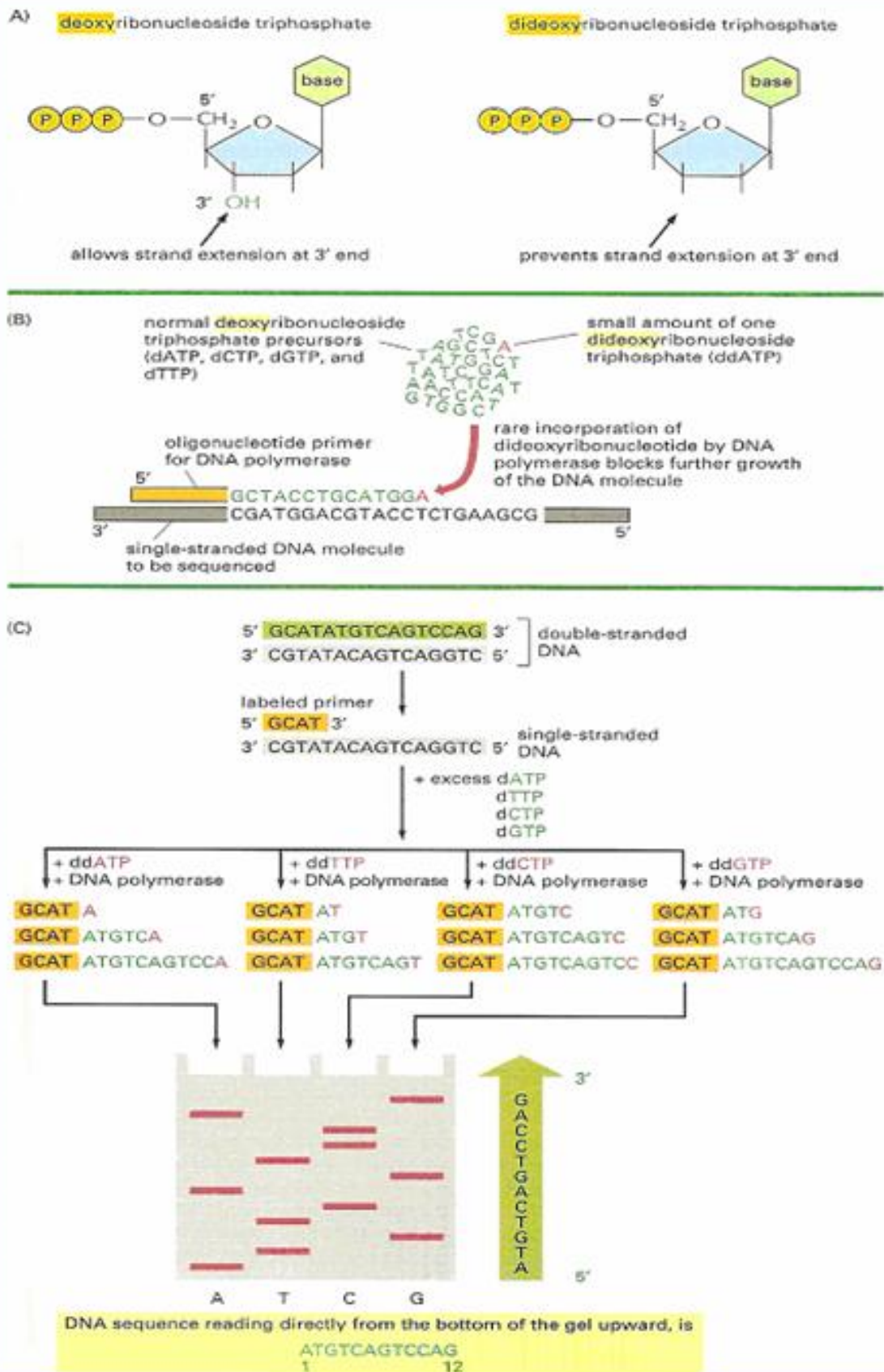


Fig. 7. Sequenciamento pelo método de Sanger.

Sequenciamento automático

Hoje em dia, todo seqüenciamento de DNA em larga escala é feito por máquinas de seqüenciamento automatizado de DNA que usam o procedimento de finalização de cadeia didesoxi descrito anteriormente, mas com algumas modificações: (1) uso de corantes fluorescentes no lugar de isótopos radioativos para detectar cadeias de DNA; (2) a separação dos produtos de todas as quatro reações didesoxi de finalização de cadeia por eletroforese em um único gel ou tubo capilar; (3) uso de fotocélulas para detectar a fluorescência dos corantes à medida que eles passam através do gel ou do tubo capilar; e (4) a transferência direta da saída da fotocélula para um computador, que analisa automaticamente, registra e imprime os resultados.

Os seqüenciadores de DNA analisam automaticamente as fitas de DNA que são marcadas com qualquer um dos quatro didesoxirribonucleosídeos terminadores (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marcados com compostos fluorescentes, que são usados para identificar cada uma das posições dos diferentes nucleotídeos na cadeia. Utilizando-se terminadores marcados, uma única reação é realizada e aplicada em um gel (placa ou capilar). Os fragmentos de DNA marcados são separados em gel de acordo com o tamanho. Um feixe de laser rastreia o gel, excitando os marcadores, que emitem luz em um comprimento de onda específico, de acordo com o corante utilizado. A luz é coletada e o padrão de espectro analisado com ajuda de programas que permitem gerar as seqüências de DNA.

Um corante fluorescente diferente é usado para marcar os produtos de cada uma das quatro reações de seqüenciamento com término de cadeia por didesoxi. Como resultado os produtos das quatro reações podem ser distinguidos por sua fluorescência à medida que passam por um gel ou por um tubo capilar. Os corantes fluorescentes podem ser acoplados aos *primers* ou diretamente aos didesoxirribonucleosídeos trifosfatos.

ANÁLISE DE MARCADORES DE DNA

Embora exista um grande número de marcadores moleculares, o princípio da análise desses marcadores é o mesmo: marcadores comuns aos acessos significam semelhanças e marcadores não-comuns significam diferenças genéticas. Os dados sobre semelhanças e diferenças genéticas entre acessos permitem gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e relacionamentos filogenéticos entre eles. Tais informações geradas pelos marcadores moleculares representam uma amostra considerável do genoma de cada material genético, sem influência do ambiente.

O primeiro passo é a codificação dos fragmentos moleculares em dados binários (no caso de marcadores dominantes) ou dados de coincidência alélica (no caso de marcadores co-dominantes). Os dados para marcadores dominantes normalmente são codificados como 1 (presença do

marcador) e 0 (ausência do marcador). Os dados para marcadores co-dominantes normalmente são codificados como 0 (ausência de alelos comuns no loco), $\frac{1}{2}$ (um alelo comum no loco) e 1 (os dois alelos comuns no loco). No caso de marcadores baseados na sequência de nucleotídeos, a codificação é a própria sequência de nucleotídeos, representados pelas quatro diferentes bases nitrogenadas do DNA (Adenina, Timina, Citosina e Guanina).

O segundo passo é utilizar os dados codificados para a estimativa de índices de similaridade ou de distância genética entre cada par de materiais genéticos. Existem vários índices descritos na literatura, como o índice de similaridade de Nei e Li (1979), Sneath e Sokal (1973), Gower (1971) também citado como coeficiente de similaridade de Jaccard, entre outros. No caso de marcadores baseados na sequência de nucleotídeos de um determinado fragmento de DNA, os índices de similaridade ou de distância são calculados com base na homologia de sequência (Kimura, 1980).

Há diferença entre dissimilaridade e distância genética. DISSIMILARIDADE utiliza dados binários para o cálculo, ou seja, marcadores dominantes. É o complemento da similaridade ($Dis = 1 - Sim$), é um índice de divergência. DISTÂNCIA utiliza frequências alélicas para seu cálculo, ou seja, marcadores codominantes. Utilizam-se de conceitos genéticos e/ou geométricos.

Com base nos índices, estabelece-se uma matriz de similaridade ou de distâncias entre os acessos, a qual vai servir de base para as análises de agrupamento e de dispersão dos acessos. As análises de agrupamento normalmente são baseadas em métodos hierárquicos, os quais podem utilizar diferentes critérios de agrupamento: vizinho mais próximo (*single linkage*), vizinho mais distante (*complete linkage*) e baseado na média das distâncias (*unweighted pair-group method using arithmetic average*).

A realização de análises genéticas utilizando marcadores moleculares seria praticamente impossível sem a ajuda computacional, principalmente quando vários acessos são analisados simultaneamente. Da união da ciência computacional com a matemática e a biologia surgiu a bioinformática. Numa definição abrangente, a bioinformática é tida como o estudo e a aplicação de técnicas computacionais e matemáticas à geração e gerenciamento de informações biológicas, em especial, da biologia molecular.

De maneira geral, a bioinformática pode combinar informações de química, física, biologia, ciência da computação e matemática/estatística para processar dados biológicos. Existem diversos softwares estatísticos disponíveis para as avaliações dos marcadores de DNA:

- TFPGA - www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm
- NTSYS - www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc.html
- ARLEQUIM - cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/
- POPGENE - www.ualberta.ca/~fyeh/
- MEGA 4 - www.megasoftware.net/mega4/mega.html
- BIONUMERICS – www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm

ATIVIDADES PRÁTICAS

1. Extração de DNA de mariposas de bicho-da-seda
2. Amplificação com marcadores ISSR
3. Eletroforese em gel de agarose
4. Avaliação do polimorfismo em marcadores ISSR

PROTOSCOLOS

I) EXTRAÇÃO DE DNA DE MARIPOSAS (*Bombyx mori*)



1. Macerar a mariposa em nitrogênio líquido (marca de 250 μ L – tubos de 2 mL);
2. Adicionar de 500 μ L a 750 μ L de TAMPÃO DE EXTRAÇÃO (TAMPÃO DE HOMOGEINIZAÇÃO);
3. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
4. Transferir o sobrenadante ($\approx$ 750 μ L) para novos tubos;
5. Adicionar ao sobrenadante 750 μ L de TAMPÃO DE DIGESTÃO PARA PROTEINASE K e 1,5 μ L de PROTEINASE K;
6. Incubar as amostras a 37°C por 3 horas ou a 60°C por 1 hora (com agitação);
7. Separar as amostras em dois tubos;
8. Acrescentar a cada tubo 750 μ L de CLOROFÓRMIO (ou o mesmo volume);
9. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
10. Transferir o sobrenadante para novo tubo e adicionar 350 μ L de FENOL e 350 μ L de CLOROFÓRMIO (1 fenol:1 clorofórmio);
11. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
12. Transferir o sobrenadante para novo tubo (1,5 mL) para precipitação;
13. Para precipitar: usar NaCl 5 M ([final] = 0,2 M) e ETANOL 100% (2x volume) ou ISOPROPANOL (0,7x volume).
Obs: Nesta fase, se tiver pouco sobrenadante, usar etanol no dobro do volume. Se tiver mais que 500 μ L de sobrenadante, usar isopropanol
14. Fechar os tubos presos em um barbante e mergulhá-los em nitrogênio líquido durante 30 segundos;
15. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
16. Descartar o sobrenadante;

17. Lavar o pellet com ETANOL 70% ou 80% ($\approx$ 70 a 100 μ L);
18. Colocar os tubos para secar;
19. Ressuspender o pellet em TE 1X + RNase;

PURIFICAÇÃO DO DNA

Obs: completar o volume com TE para 200 μ L antes de iniciar a purificação.

20. Adicionar 1 fenol :1 clorofórmio: 100 μ L de FENOL e 100 μ L de CLOROFÓRMIO;
21. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
22. Transferir o sobrenadante para novo tubo e adicionar CLOROFÓRMIO no mesmo volume (200 μ L);
23. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
24. Transferir o sobrenadante para novo tubo e precipitar com NaCl 5 M (14 μ L) e ETANOL 100% (2x volume) ou ISOPROPANOL (0,7x volume);
25. Mergulhar as amostras em nitrogênio líquido durante 30 segundos;
26. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
27. Descartar o sobrenadante;
28. Lavar com etanol 70% e deixar secar;
29. Ressuspender o pellet com TE 1X (autoclavado 2x de 45' e filtrado);
30. Manter as amostras em freezer.

A. TAMPÃO DE EXTRAÇÃO (TAMPÃO DE HOMOGEINIZAÇÃO)

	[inicial]	[final]
200 μ L de Tris-HCl pH 7,5	1 M	10 mM
240 μ L de NaCl	5 M	60mM
400 μ L de EDTA pH 8,0	0,5 M	10 mM
6.250 μ L de sacarose	16%	5%
24 μ L de espermidina	125mM	0,15mM
60 μ L de espermina	50mM	0,15mM
Completar volume com água mili-Q para 20 mL		

B. TAMPÃO PARA DIGESTÃO DE PROTEINASE K

	[inicial]	[final]
4.000 μ L de Tris-HCl pH 9,0	1 M	0,2 M
1.200 μ L de EDTA pH 8,0	0,5 M	30 mM
2.000 μ L de SDS	20%	2%
6.250 μ L de sacarose	16%	5%
Completar volume com água mili-Q para 20 mL		

2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Objetivo: amplificar via ISSR-PCR DNAs de *Bombyx mori*.

Introdução

Em 1985, foi descrita a metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR, de *polymerase chain reaction*). Seu idealizador, Kary Mullis, recebeu, por isso, o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1993. A PCR permite a produção de grandes quantidades de um determinado segmento de DNA *in vitro* a partir de uma pequena quantidade de DNA-molde, evitando assim a necessidade de introdução (clonagem) do DNA de interesse em bactérias.

Material:

- Oligonucleotídeos ISSR (*primers*) (25 mM)
- DNA-molde (DNA de *Bombyx mori*)
- dNTPs (desoxirribonucleotídeos): dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 mM)
- Tampão da *Taq* DNA-polimerase (10X)
- *Taq* DNA-polimerase (1 U/μl)
- MgCl₂ (50 mM)

Os iniciadores (*primers*) são oligonucleotídeos complementares a seqüências do DNA. Nesse caso serão utilizados *primers* que contem seqüências repetitivas de microssatélites. O segmento de DNA amplificado inclui a seqüência nucleotídica situada entre dois blocos de microssatélites, produzindo um marcador multilocos útil para análise de diversidade genética.

A temperatura de anelamento dos iniciadores ao DNA-molde na PCR é definida com base na T_m. Geralmente, ela deve ser de cerca de 20 a 25°C abaixo da T_m dos iniciadores.

Estimativa da T_m de iniciadores

A seguinte fórmula pode ser utilizada para estimar a temperatura média de fusão (T_m) de um iniciador:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Procedimentos:

1. Pipetar as seguintes soluções em um tubo de centrífuga de 0,5 mL:

Água miliQ 8,2 μL

Tampão (10X)* 1,5 μL

dNTPs (1 mM) 0,8 μL

Iniciadores (*primers*; 25 mM) 2,0 µL

MgCl₂ (50 mM) 0,3 µL

Taq DNA-polimerase (1 U/µl) 0,7 µL

DNA molde (60 ng/µl) 1,5 µL

Volume total 15 µL

* 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, estabilizantes, da marca Invitrogen.

Nota: Uma unidade enzimática da DNA-polimerase é definida como a quantidade de enzima necessária para catalizar a incorporação de 10 nmol de dNTP durante 30 min à 74°C.

2. Colocar a reação em um termociclador com a seguinte programação de ciclos de temperatura:

Fase do PCR Temperatura/tempo No. Ciclos

94°C/ 2 min - Temperatura Inicial/Denaturação do DNA

94°C/ 30 seg - Denaturação

50°C/ 30 seg - Temperatura de Anelamento dos *primers*

72°C/ 1 min - Extensão ou Amplificação do DNA

72°C/ 10 min - Extensão Final

4° C/ indefinidamente - Armazenamento

3. Preparar 10 µl do produto da reação de PCR para eletroforese em gel de agarose.

4. Submeter as amostra a eletroforese em gel de agarose 1,5% (conforme roteiro “Eletroforese em Gel de Agarose”).

3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Objetivo: preparar um gel de agarose para análise de ácidos nucléicos.

Materiais:

- TBE 5X (Composição para 1 litro)

54 g de tris-HCl

27,5 g de ácido bórico

20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0

- Gel de agarose 1,5%

100 mL de TBE 1X

1,5 g agarose

- Brometo de etídeo (1 mg/ml)

Usar 1 µL para cada 10 mL de gel.

Cuidado! O brometo de etídeo é mutagênico e cancerígeno. Não tocar nos géis corados com brometo de etídeo sem a devida proteção. Use sempre luvas para manusear o frasco e o gel com brometo de etídeo.

- *Transiluminador ultravioleta e máscaras de proteção*

Procedimentos

- Preparação do gel:

Preparar a solução de agarose em frasco de Erlenmeyer e aquecê-la (até a fervura) em forno de microondas até a sua completa solubilização. O frasco deve ser agitado freqüentemente para homogeneização e para evitar transbordamento.

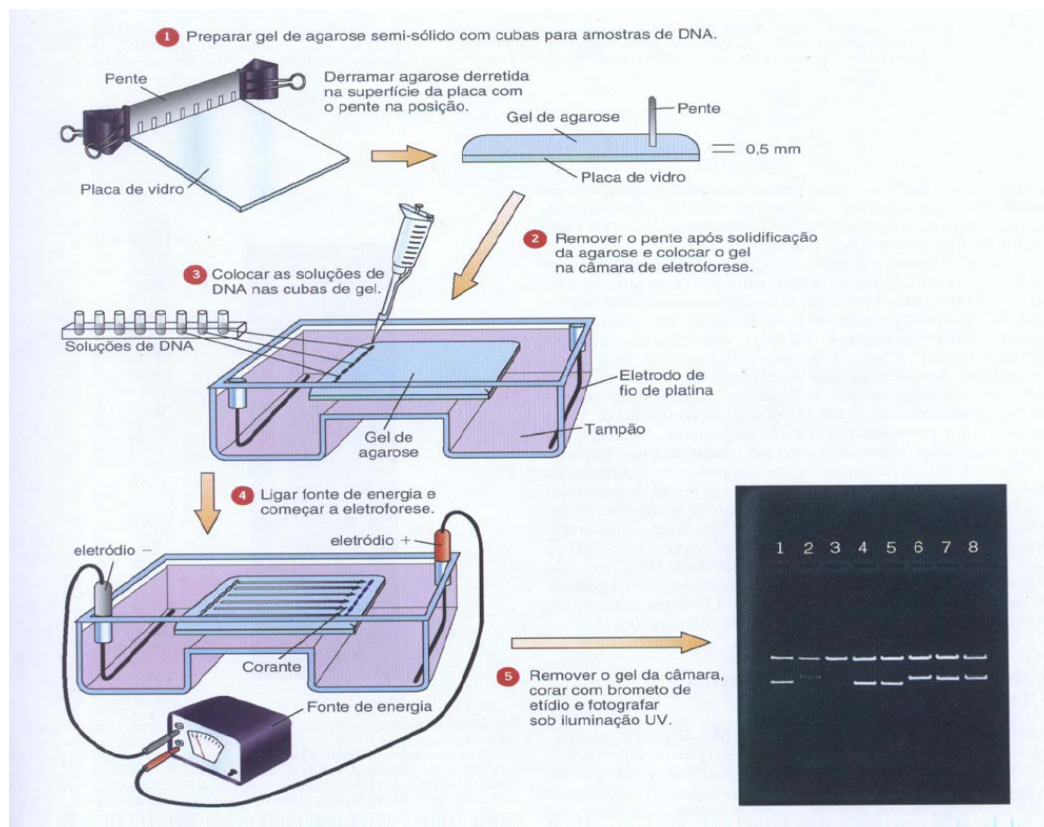
Após a solubilização, a solução de agarose deve ser resfriada por alguns minutos e a ela devem ser adicionados solução de brometo de etídio (1 mg/ml). Depois disso, agitar a solução e vertê-la sobre uma placa-molde de gel com o pente já montado. Aguardar a polimerização a temperatura ambiente.

- Preparação das amostras:

Em parafilme misturar 7 µl de cada amostra de DNA mais 3 µl de loading.

- Eletroforese:

1. Colocar o gel de agarose na cuba de eletroforese e submergi-lo em TBE 1X.
2. Aplicar as amostras no gel com uma micropipeta
4. Submeter as amostras a eletroforese a uma voltagem de 100V, por aproximadamente 60 min.
5. Visualizar as amostras de DNA resolvidas eletroforeticamente colocando o gel sobre transluminador com iluminação ultravioleta (Cuidado! O ultravioleta pode causar queimaduras e é mutagênico. Não visualizar os géis sem as devidas precauções de segurança).



INFORMAÇÕES ADICIONAIS SOBRE REAGENTES E METODOLOGIAS COMUMENTE UTILIZADOS EM MÉTODOS EXPERIMENTAIS PARA A MANIPULAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

EDTA: (ácido etilenodiaminotetracético) inibe a atividade de desoxirribonucleases (DNases) pois atua como agente quelante de íons essenciais para a atividade destas enzimas (Mg^{2+})

SDS: é um detergente aniônico que solubiliza lipídeos. É um desnaturante de proteínas e também rompe ligações não-covalentes inter-subunidades de proteínas oligoméricas. Também é utilizado para se certificar que nenhuma nuclease que não depende de Mg^{2+} cause qualquer degradação no DNA.

NaCl: íons no meio aquoso podem romper ligações iônicas de cadeias polipeptídicas. Também auxiliam na dissociação das proteínas ligadas aos ácidos nucleicos.

Fenol-clorofórmio: contaminantes protéicos são desnaturados e há partição das mesmas na fase orgânica ou interface entre as fases orgânica e aquosa, enquanto que ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. A utilização de fenol-clorofórmio é mais eficiente do que a utilização de somente um deles. Lipídeos, grandes polissacarídeos e proteínas complexadas ao SDS permanecem na fase fenólica.

Álcool isoamílico: reduz a formação de espuma e ajuda a separação e a manutenção da estabilidade das camadas orgânica e aquosa após a separação por centrifugação.

Etanol: É utilizado para precipitar ácidos nucleicos com mais do que 15 nucleotídeos. Sais e outros solutos tais como fenol e clorofórmio ficam em solução enquanto que ácidos nucleicos formam um precipitado branco que pode ser coletado por centrifugação.

Análise eletroforética em gel de agarose: A agarose é um polímero linear extraído de algas marinhas, composto de D-Galactose e L-Galactose. Quando a agarose é fundida e posteriormente resfriada, ocorre a formação de uma matriz ou gel, que serve como uma peneira para a separação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. A eletroforese em gel de agarose é uma técnica simples, fácil e sensível, capaz de separar fragmentos com maior resolução do que outros métodos, como a centrifugação em gradientes de CsCl (cloreto de Césio), por exemplo. Outra vantagem é que os ácidos nucleicos podem ser visualizados no gel, pelo uso do corante fluorescente Brometo de Etídeo. Este corante se intercala entre os pares de bases empilhados da molécula de DNA/RNA. A

fluorescência do Brometo de Etídeo associado a ácidos nucleicos é maior do que livre em solução, permitindo, deste modo, que pequenas quantidades de DNA/RNA sejam detectadas (cerca de 10ng DNA ou RNA por banda).

Reação em cadeia da polimerase (PCR): Dois desenvolvimentos tecnológicos simplificaram e tornaram mais eficiente a PCR: (1) a utilização de DNA-polimerase termoestáveis, principalmente a enzima isolada de *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA-polimerase), que permanece ativa mesmo em temperaturas altas o suficiente para desnaturar a fita dupla do DNA. A *Taq* DNA-polimerase tem uma meia-vida de 40 min a 94 - 95°C. Esta enzima consiste de uma única cadeia polipeptídica, com uma massa molecular de 95 kDa. A *Taq* DNA-polimerase tem atividade máxima em uma temperatura em torno de 75°C e no pH 9. Uma unidade de atividade de uma DNA-polimerase é definida como a quantidade de enzima necessária para catalizar a incorporação de 10 nmol de dNTP em uma reação de polimerização de 30 min nas condições ótimas para a enzima. (2) o desenvolvimento do termociclador programável permitiu que a alternância das etapas de aquecimento e resfriamento de cada ciclo da PCR pudesse ser automatizada, o trabalho manual tedioso de transferência das amostras entre blocos de aquecimento em diferentes temperaturas.

Os componentes básicos necessários para a execução de uma PCR são:

- DNA-molde contendo a sequência de DNA a ser amplificada
- DNA-polimerase (preferencialmente uma termo-estável)
- Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares a sequências (conhecidas) que flanqueiam o segmento de DNA a ser amplificado. Os iniciadores devem ter orientações opostas, isto é, cada um deve anelar em uma fita diferente do DNA-molde de fita dupla.
- desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- tampão de reação da DNA-polimerase

As etapas de uma PCR:

A PCR consiste de várias etapas que são repetidas durante o processo de amplificação do DNA molde:

- 1) Desnaturação: a fita dupla do DNA-molde é desnaturada termicamente em suas fitas simples (94-95°C, por 15 s a 2 min)
- 2) Anelamento: os iniciadores (oligonucleotídeos) anelam por complementaridade às fitas do DNA-molde a uma temperatura mais baixa (20 a 25°C abaixo da T_m dos iniciadores) do que a utilizada na etapa anterior (40-60°C, por 30 s a 1 min)

3) Extensão (síntese): os iniciadores anelados ao DNA-molde servem como pontos de partida para que a DNA-polimerase os alongue, sintetizando uma fita de DNA complementar e de orientação inversa àquela do DNA-molde. Isso é feito a partir da incorporação sequencial de dNTPs na extremidade 3' da cadeia nascente. Ao término desta etapa, foi dobrado o número de fitas correspondente a região amplificável do molde (entre os sítios de anelamento dos iniciadores). A temperatura para extensão é geralmente de 72°C e a sua duração é de 1 min por kb do produto de amplificação esperado.

As 3 etapas descritas acima constituem **um ciclo**, que é repetido várias vezes (de 20 a 40 vezes). Ao final de cada ciclo, ocorre a duplicação do número de moléculas de DNA de fita dupla que havia no ciclo anterior. Isto é, há uma amplificação exponencial da sequência do DNA-alvo: 2^n , onde n = número de ciclos. Por exemplo, ao término de 20 ciclos haverá 2^{20} (mais de 1 milhão) cópias da porção amplificada do DNA-molde. A concentração dos iniciadores é alta (em excesso), o que faz com que a hibridização (anelamento) dos mesmos ao DNA-molde ocorra rapidamente (em segundos), após a desnaturação e o resfriamento. O DNA amplificado pode então ser analisado (quanto ao tamanho, quantidade e sequência) por eletroforese em gel de agarose, clonagem e/ou seqüenciamento.

REFERÊNCIAS

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995, 220p.
- GUPTA, M.; CHYI, Y-S.; ROMERO-SEVERSON J.; OWEN, J. L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 998-1006, 1994.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G. & ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 51 Pt 1: 263-273, 1986.
- PRIMACK, Richard. *Essentials Of Conservation Biology*. 4th Edition, Sinauer Associates, 2006.
- SANKAR, A. A.; MOORE, G. A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of genetic linkage map. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 206-214, 2001.
- ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20:176-183, 1994.

EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DE EUCARIOTOS E ANÁLISE ESTRUTURAL *IN SILICO*

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Fernandez
Prof. Dr. Flavio Augusto Vicente Seixas
Dr. Fábio Rogério Rosado
Doutorando Quirino Alves de Lima Neto

INTRODUÇÃO

Proteínas HMG (High Mobility Group)

As proteínas HMGs participam da estrutura e da plasticidade funcional da cromatina, mas sua função biológica em diferentes processos ainda não é bem conhecida. Devido à importância da participação dessas proteínas no desenvolvimento e na tumorigênese, uma área ampla de investigação vem se fortalecendo na compreensão de suas interações no metabolismo celular (Hock et al., 2007).

As HMG são agrupadas em uma superfamília pela sua similaridade nas propriedades físicas e químicas e porque todas agem como elementos estruturais que afetam processos DNA dependentes na cromatina. Essa superfamília é dividida em três famílias: HMGN (anteriormente denominada HMG14-17), HMGA (anteriormente denominada HMG Y/I) e HMGB (anteriormente denominada HMG1/2). As HMGN têm a extremidade carboxiterminal ácida e motivos carregados positivamente, os quais ligam com os nucleossomos e provocam a alteração tanto da estrutura local quanto supra-molecular da fibra da cromatina.

A família HMGA abriga quatro membros (HMGA1; HMGA2; HMGA1c e HMGA2), que possuem múltiplos motivos AT-hooks. A HMGB é constituída de três variantes (HMGB1; HMGB2 e HMGB3), as quais possuem dois motivos funcionais HMG-box, os quais penetram no sulco menor do DNA e curvam a molécula. Os segmentos caracterizados como HMG-box das HMGB também tem afinidade por segmentos intrinsecamente curvos no DNA (DNA *bent*) (Ugrinova et al., 2007). As caudas carboxi-terminal tanto da HMGA como HMGB são capazes de interagir com outras moléculas e estruturas não usuais do DNA.

A HMGA1 possivelmente direciona o complexo de iniciação da replicação em mamíferos, e a participação das HMGs na estruturação de sítios iniciadores da replicação um aspecto a ser explorado em diferentes sistemas biológicos.

Proteína HMGB1

As proteínas HMGB1 são expressas nas células de todos os vertebrados, e também são encontradas em bactérias, leveduras e plantas. Este grupo de proteínas, inicialmente foi considerado como exclusivamente nuclear, no entanto, atualmente sabe-se que estas proteínas são encontradas no citoplasma (como em células hepáticas e do sistema nervoso) e em alguns casos também no ambiente extracelular.

Vários processos biologicamente importantes estão relacionados com as proteínas HMGB1 (Tabela 1). Dentre eles, interações com a forma B do DNA, interações com fatores de transcrição e formas alternativas do DNA (DNA *supercoiled* e minicírculos) são apenas alguns exemplos de sítios de reconhecimento das HMGB1, que apresentam maior ou menor afinidade por estas estruturas. Distorções diretas na estrutura do DNA, por mecanismos de *bending* ou *looping*, o que altera a topologia do DNA também são relatadas (Paull et al., 1993; Sheflin and Spaulding, 1989).

Tabela 1. Funções celulares conhecidas envolvendo a proteína HMGB1

1. Controle do desenvolvimento
2. Diferenciação celular
3. Recrutamento de proteínas envolvidas na transcrição
4. Recrutamento de proteínas envolvidas na diferenciação
5. Remodelamento dos nucleossomos
6. Participação de morfogênese sexual
7. Mediadora na resposta inflamatória

Recentemente alguns autores têm demonstrado a presença das HMGB1 no meio extracelular, e sua função nestes processos extracelulares como citocina mediadora. Além disso, a administração de proteínas HMGB1 em animais normais desencadeia respostas inflamatórias clássicas, como anorexia, perda de peso, febre, lesões pulmonares agudas, disfunção da barreira epitelial, arritmia e morte (Yang et al., 2005). As proteínas HMGB1 possuem um par de motivos homólogos de ligação ao DNA chamados de HMG-boxes, A e B, encontrados em várias proteínas conhecidas como família das proteínas HMG-box (Thomas e Travers, 2001). O domínio HMG-box é específico de células eucarióticas.

Tomando como base as características de ligação ao DNA e a sequência primária da proteína, as proteínas HMG são divididas em duas grandes subfamílias. A primeira subfamília inclui proteínas com várias HMG-boxes, como por exemplo, as HMG-1 e HMG-2, que apresentam afinidade inespecífica por DNA. A segunda subfamília é composta por proteínas com um único

domínio HMG, e possuem a capacidade de ligação sequência-específicas a variantes com o motivo consenso (A/T)(A/T)CAAAG.

A estrutura geral das proteínas HMGB1, mostrando as duas HMG-boxes (A) e (B) com afinidade a fragmentos de DNA e o domínio ácido C-terminal, com afinidade à sequências de RNA é representado na Figura 1.

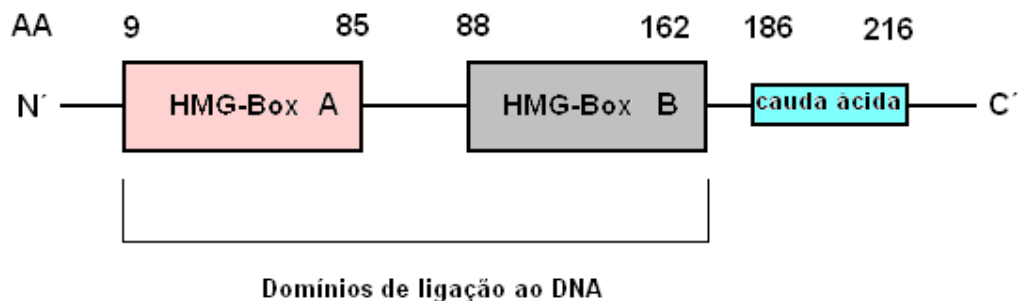
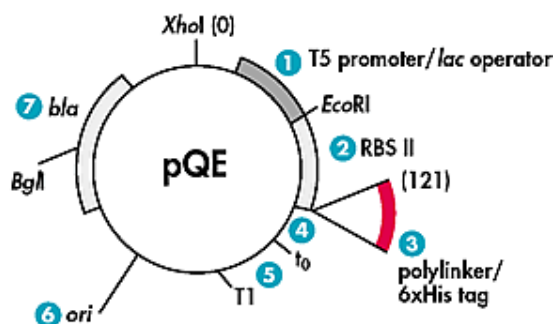


Figura 1. Estrutura geral da proteína HMGB1. Adaptado de Yang et al. (2005).

ROTEIRO DE AULA PRÁTICA

1. Expressão Heteróloga e Purificação da Proteína HMGB1

A proteína HMGB1 humana está clonada no vetor de expressão da QIAGEN denominado pQE-80L. Este plasmídeo foi desenvolvido especificamente para clonagem e expressão de proteínas utilizando como hospedeiro a bactéria *Escherichia coli*. A série pQE-80L foi desenhada de forma a apresentar 6 resíduos de histidina (6xHis-tagged) na extremidade N-terminal da proteína produzida, o que torna possível a purificação desta proteína utilizando colunas de purificação preenchidas com uma resina de níquel. Além do mais, a síntese da proteína é modulada com IPTG, o qual se liga no operador *lac*, possibilitando o controle da transcrição do gene e produção da proteína.



Elements present in QIAexpress pQE Vectors

Element	Description
1 Optimized promoter/operator element	Consists of the phage T5 promoter and two <i>lac</i> operator sequences, which increase the probability of <i>lac</i> repressor binding and ensure efficient repression of the powerful T5 promoter
2 Synthetic ribosomal binding site RBSII	For efficient translation
3 6xHis-tag coding sequence	Either 5' or 3' to the polylinker cloning region
4 Translational stop codons	In all reading frames for convenient preparation of expression constructs
5 Two strong transcriptional terminators	t ₀ from phage lambda, and T1 from the <i>mmB</i> operon of <i>E. coli</i> , to prevent read-through transcription and ensure stability of the expression construct
6 ColE1 origin of replication	From pBR322
7 beta-lactamase gene (<i>bla</i>)	Confers ampicillin resistance

Fonte: <http://www.qiagen.com/products/protein/expression/qiaexpressexpressionsystem/cis-repressedpqqevector.aspx?ShowInfo=1>

Protocolo:

- Inocular uma colônia isolada em 10mL de LB AMP (100µg/mL), overnight à 37° C sob agitação.

No dia seguinte:

1. Inocular em 1L de meio LB AMP (100µg/mL) e crescer à 37° C sob agitação (~200 rpm) até $D.O_{600nm} \pm 0,6$
2. Coletar 100µL da suspensão e induzir o restante com 0.5mM IPTG (500µL IPTG 1M por litro) à 25° C por 5h.
3. Coletar 100µL (tempo 5h).
4. Centrifugar 7700g (8000 RPM no rotor Sorvall SL-250T) por 10min, à 4° C.
5. Guardar o pellet no -80° C (pode ser no -20°C).

No dia seguinte:

1. Ressuspender cada litro de cultura em 30mL de Tampão de Lise + PMSF (Concentração final, Cf, 1mM) + Benzamidina (Cf 0,5mM)

Tampão de Lise: 50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
Ajustar para pH 8.0 com NaOH.

2. Sonicar (output entre 3-4 / 5 ciclos de 20 segundos com intervalos de 20 segundos no gelo)
3. Centrifugar 12000RPM por 10 min. à 4°C (ou 15000RPM, não precisa filtrar)
4. Filtrar o sobrenadante clarificado (filtro 0,45µM).
5. Passar a mostra na coluna 2 vezes.
6. Lavar com Tampão de lavagem (±30mL)

Tampão de lavagem: 50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
20 mM Imidazol
Ajustar para pH 8.0 com NaOH.

7. Eluir em 2mL de tampão de eluição e recolher 4 frações de 500µL

Tampão de Eluição: 50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl

250 mM Imidazol

Ajustar para pH 8.0 com NaOH.

8. Correr um gel SDS-PAGE 12% para visualizar quais as frações mais ricas em proteína 10µL de cada fração
9. Juntar as frações mais ricas e dialisar em tampão de diálise (4L) overnight à 4°C.

Tampão de Diálise: 10mM Tris-HCl pH 7,6
50mM KCl
0,1mM EDTA pH 8,0
0,5mM DTT

10. Recolher a fração dialisada do saquinho e dosar utilizando lisozima para construir a curva padrão

2. Eletroforese de Proteínas - SDS PAGE

2.1 Fundamentos da Eletroforese

Eletroforese pode ser definida como “o movimento de moléculas eletricamente carregadas, pela aplicação de um campo elétrico, através de um suporte”. Como a velocidade em que as moléculas se movem em um campo elétrico depende de suas cargas, forma e tamanho, a eletroforese tem sido amplamente estudada como ferramenta para separação molecular. Como ferramenta analítica, a eletroforese é simples e relativamente rápida. É usada para análise, separação e purificação de moléculas grandes como proteínas e ácidos nucleicos, mas também pode ser adaptada para a separação de moléculas mais simples (desde que carregadas) como açúcares simples, aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e até mesmo íons. Métodos de detecção de alta sensibilidade têm sido desenvolvidos para monitorar e analisar separações eletroforéticas.

A eletroforese de macromoléculas normalmente é realizada aplicando-se uma fina camada de amostra em uma solução estabilizada em uma matriz porosa. Sob a influência de uma voltagem aplicada, os diferentes tipos de moléculas presentes em uma amostra movem-se através da matriz com velocidades diferentes. Ao fim da separação, as moléculas de tamanho diferentes são detectadas em diferentes posições na matriz. Diferentes tipos de matriz podem ser utilizados, desde papel, acetato de celulose, géis compostos por agarose ou poliacrilamida. Nos géis de poliacrilamida e agarose, a matriz pode ser tamanho-seletiva no processo de separação, controlando-se a concentração dos componentes do gel. Ao final da separação, as bandas podem ser coradas com diferentes tipos de produtos (Ex. Brometo de etídeo para DNA, Coomassie Brilliant Blue para proteínas) visualizadas e escaneadas por diferentes processos. No SDS-PAGE, as

amostras de proteínas migram em uma condição desnaturante, pela ação do SDS (Dodecilsulfato de sódio) e outros componentes no sistema (Figura 2).

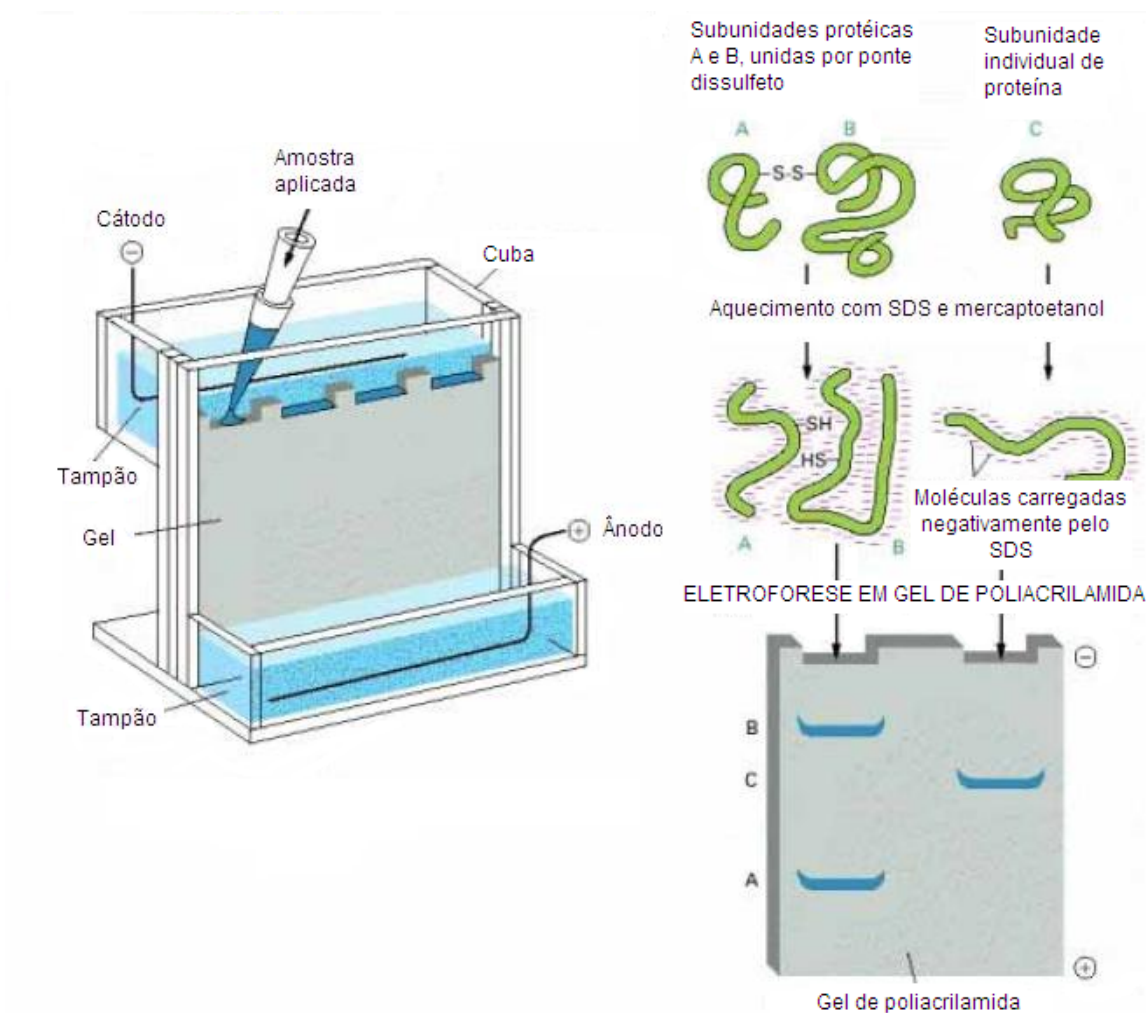


Figura 2. Esquema de montagem do cassete de transferência por Western Blotting. Adaptado do manual de instruções do sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad).

2.2 Preparação de Gel de Poliacrilamida – SDS PAGE para a separação de proteínas

A) Tampão de corrida (tank buffer) (0.025 M Tris, 0.192 M Glicina, 0.1% SDS, pH 8.3, 10 litros).

B) Gel de Separação a 12 % (Resolving gel) para 10 ml.

componente	Volume em ml
Água dest.	3.3
30% sol.	4
Acrilamida/bisacrilamida	
1.5M Tris (pH 8.8) Tampão inferior	2.5
10% SDS	0.1
10% Persulfato de amônio	0.1
TEMED	0.004

C) Gel de Empilhamento a 5 % (Stacking gel) para 5 ml

componente	Volume em ml
Água dest.	3.4
30% sol.	0.83
Acrilamida/bisacrilamida	
1.5M Tris (pH 8.8) Tampão inferior	0.63
10% SDS	0.05
10% Persulfato de amônio	0.05
TEMED	0.005

D) Preparo das amostras

Misturar as amostras protéicas com tampão de amostra (q.s.p. 1X (loading buffer-3X)). Ferver as amostras por 5 minutos. Aplicar no gel seguindo a ordem estabelecida e correr a eletroforese até as amostras passarem pelo gel de empilhamento (60 volts) e depois aumentar a voltagem (100 volts) acompanhando a migração.

3. Western blotting

3.1 Fundamentos do Western blotting

O Western Blotting localiza, com o uso de anticorpos específicos, proteínas que foram previamente separadas através de eletroforese em gel (Figura 3). O blot utiliza membranas, normalmente de nitrocelulose ou PVDF (polyvinylidene fluoride). O gel é colocado em contato com a membrana e a aplicação de uma corrente elétrica força as proteínas a se moverem do gel para a membrana e se aderirem a ela. A membrana então é uma réplica do padrão de proteínas no gel, e é

subsequentemente corada com o corante de Ponceau – S e incubada com anticorpos específicos que irão se ligar à proteína de interesse e localizá-la entre as demais proteínas.

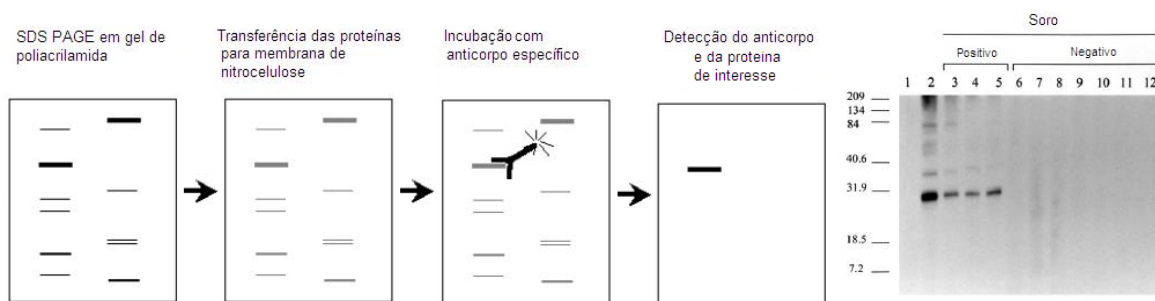


Figura 3. Esquema geral do Western Blotting. Adaptado do manual de instruções do sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad).

3.2 Procedimento (Prepare o tampão de transferência anteriormente e mantenha em geladeira)

A) Tampão de transferência para Western (submerso): (14.4 g glicina, 3 g Tris, 900 ml de água destilada, 100 ml metanol) - Metanol é muito tóxico, use luvas durante o prepare e manuseio. pH final: 8.3 Resfriar (4° C) antes de usar.

B) Montagem do sistema de transferência

1. Retire o (s) cassette (s) do mini-gel (placas e gel) do sistema Bio-Rad após a migração das proteínas na eletroforese.
2. Remova o (s) gel (is) das placa com cuidado pois as placas de vidro (principalmente a placa fina) é muito frágil. Com auxílio da espátula verde de plástico (Bio-Rad) remova o gel de empilhamento completamente. Lave o gel com água destilada para remover o excesso de SDS.
3. Coloque o gel de separação em tampão de transferência por 15 minutos.
4. Molhe a membrana de nitrocelulose com água destilada estéril e coloque em tampão de transferência por 15 minutos. Coloque também os papéis de filtro Whatman e esponjas espaçadoras em tampão de transferência por 15 minutos.
5. Monte o cassete de transferência de acordo com a ordem abaixo, com todas as partes previamente equilibradas em tampão de transferência por pelo menos 15 minutos.
6. Montar o sistema de acordo com a Figura 4 (Tenha certeza de que não ficaram bolhas de ar entre o gel e a membrana, retirando as bolhas rolando a extremidade de uma pipeta ou tubo de ensaio sobre a membrana):

Após a montagem, coloque o cassete no sistema e coloque o sistema de resfriamento no interior da cuba. Mantenha a cuba refrigerada durante o procedimento. Ligue o sistema (70 volts) por 40

minutos depois aumente a voltagem (100 volts) por mais 20 minutos. Verifique se há pequenas bolhas se formando nos eletrodos (eletrólise).

Ponceau-S stain

C) Coloração de Ponceau-S. (0.5% Ponceau S (w/v) 1% ácido acético (v/v). Complete para 100 ml com água destilada). A coloração de Ponceau-S é importante por ser temporária, você poderá comparar sua membrana após a detecção com anticorpos com a coloração de Ponceau-S. Este corante pode ser re-utilizado várias vezes.

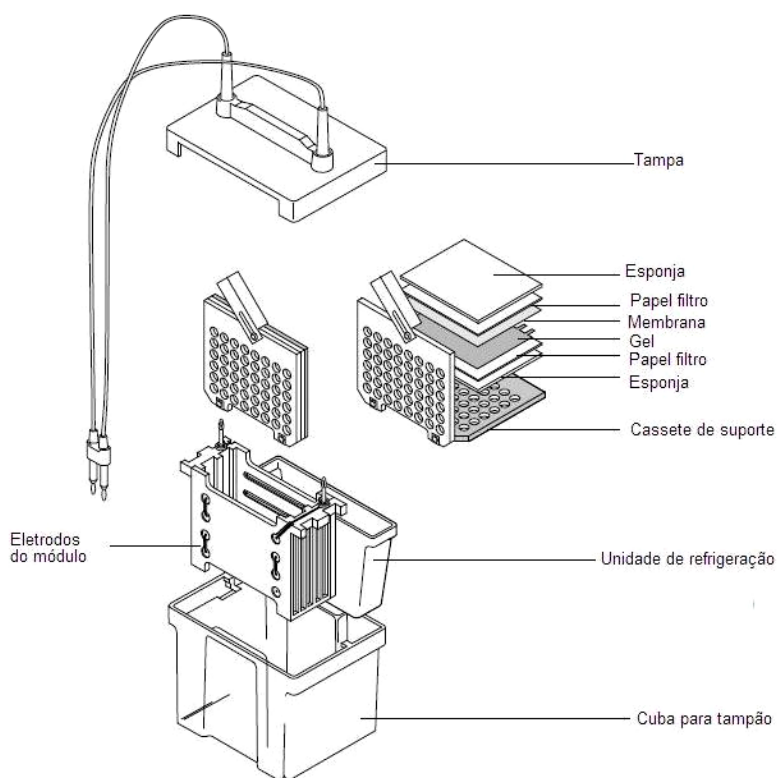


Figura 4. Esquema de montagem do cassete de transferência por Western Blotting. Adaptado do manual de instruções do sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad).

1. Incube a membrana por 5 minutos no corante. Recupere o corante e guarde.
2. Descore a membrana em um recipiente com água destilada, troque a água e repita por 3X. (ou até ficar completamente limpa).
3. Com o pisquete, lave a membrana até que a mesma fique branca e as proteínas sejam visíveis (lave dos dois lados). Corte a membrana do tamanho adequado, deixando uma margem de 0,5 cm de todos os lados (a tesoura deve estar limpa, manipular a membrana com luvas e pinças limpas).
4. Descore com mais água destilada para remover o corante residual.

5. Neste ponto, a membrana deve ser escaneada ou fotografada, para uso futuro em análise de imunoblotting, ou desidratadas, envoltas em papel e armazenadas a 4°C para uso futuro.

D) Análise em Immunoblotting – Detecção com ECP Plus Westwern Blotting reagents.

Antes de iniciar esta etapa do protocolo, incube a membrana em TBS-T até a remoção completa do Ponceau-S (normalmente 10 min. são suficientes)

1. Bloqueie a membrana incubando em solução a 4% (w/v) de leite em pó desnatado (Molico) em TBS-T 0.1% (v/v) Tween 20 (TBS-T) for 1 hora a temperatura ambiente.
2. Lave a membrana duas vezes com TBS-T (sem leite). (Enquanto é feita a lavagem preparar o anticorpo primário).
3. Diluir o anticorpo primário em TBS-T/leite (4%) . Diluição apropriada (1:2000). Incubar a membrana em contato com a solução do anticorpo primário em saquinho plástico vedado por 1 hora em temperatura ambiente (ou overnight a 3 ~8 °C) sob agitação (a diluição do anticorpo primário pode ser diferente dependendo do material).
4. Lavar a membrana 3 X, por 5 minutos com TBS-T. Nas lavagens usar ~ (4 mL/cm²). Enquanto é feita a lavagem preparar anticorpo secundário.
5. Diluir o anticorpo secundário em TBS-T/leite (4%). Diluição apropriada (1:10.000). Incubar com anticorpo secundário a temperatura ambiente por 1 hora (a diluição do anticorpo primário pode ser diferente dependendo do material).
6. Lavar a membrana 3 X, por 5 minutos com TBS-T. Preparar a solução de revelação (Misturar os reagentes A e B em uma relação de 40:1, por ex. 0,5 mL da sol. A + 12.5 µL da sol. B, suficiente para duas membranas). Misturar os reagentes imediatamente antes de sua utilização, no escuro.
7. Coloque a membrana em uma placa de Petri limpa, com o lado das proteínas para cima. Pipete a solução de revelação sobre a membrana e incline a placa em vários sentidos para que a solução cubra toda a superfície da membrana. Incube a membrana na solução de revelação por 3 minutos, cobrindo a membrana com papel alumínio para evitar a luz (ligar o Storm).
8. Com um pissete, lave a membrana abundantemente com água destilada, usando pressão para retirar a substância de revelação.
9. Coloque a membrana entre duas folhas de plástico transparente apoiado em uma superfície limpa, e com papel higiênico remova as bolhas de ar cuidadosamente.
10. Detectar no Storm (canal azul) ou nos dois canais (azul e vermelho, para confirmação do padrão se necessário) – lado das proteínas para baixo. Se a imagem aparecer muito escura, repita os passos de lavagem da membrana com água destilada e pissete, sempre trocando as

folhas de plástico para proteger a membrana e realizando nova detecção, até que o “background” esteja claro e as bandas sejam visíveis.

ANÁLISE ESTRUTURAL *IN SILICO*

INTRODUÇÃO

Este estudo visa apresentar as bases de dados repositórias de estruturas (primária, terciária e quaternária) de proteínas de diversos organismos e, a partir delas, demonstrar as ferramentas de bioinformática mais comumente aplicadas ao estudo das proteínas e, principalmente, como processar as informações fornecidas por tais ferramentas.

Inicialmente iremos mostrar que a partir da sequência de um gene, é possível prever a sequência de uma proteína e, a partir dela, chegar ao seu nível de enovelamento máximo. A partir da sequência de aminoácidos, é possível prever alguns parâmetros físico-químicos que predizem seu comportamento *in vitro* e assim, facilitam o seu entendimento e comparação.

Se esta proteína for de interesse da área médica, é possível utilizar sua estrutura para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças crônicas e infecciosas, por meio de uma técnica chamada de varredura virtual ou “virtual screening”.

Este material foi estruturado na forma de tutorial de forma a explorar algumas das principais bases de dados repositórias de estruturas e as ferramentas de bioinformáticas mais comumente utilizadas em proteômica.

BASES DE DADOS (REPOSITÓRIO DE SEQUENCIAS)

1) Bancos de dados **Primários**

São repositórios que armazenam informações obtidas diretamente de técnicas experimentais como sequenciamento, difração de raios-X, NMR. Seu conteúdo é submetido por pesquisadores (autores), os quais são responsáveis e tem total controle sobre o conteúdo submetido.

São exemplos de bancos primários, o **GenBank**, **PIR**, **EMBL**, **DDJB**, **SNP**, **GEO**, **PDB**.

2) Bancos de dados **Secundários**

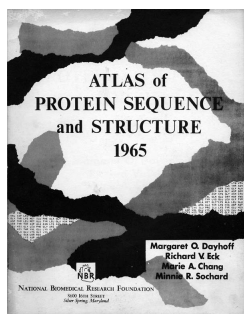
São repositórios construídos a partir do banco de dados primário. Seu conteúdo e informações são resultantes da análise e processamento dos primários. Seu conteúdo é controlado por curadores como o European Bioinformatics Institute (EBI) e o Swiss Institute of Bioinformatics (SIB).

São exemplos de bancos de dados secundários: **Refseq**, **RefSNP**, **UniGene**, **NCBI Protein**, **Structure**, **Conserved Domain**, **SwissProt**, **Pfam**, etc.

EXERCÍCIOS:

1) Explorando os bancos de dados primários. Acesse: <http://pir.georgetown.edu/>

PIR foi criado em 1984 pela Fundação Nacional de Pesquisa Biomédica (NBRF)



Banco primário de seqüências de proteínas.

The Protein Information Resource (PIR) é um sistema público integrado de recursos de bioinformática para apoiar pesquisas em genômica, proteômica, pesquisa em biologia de sistemas e estudos científicos



Sequências depositadas têm várias notações biológicas, como:

- A função da proteína;
- Informações de homologia,
- Sequências relacionadas (*features*).

Promove a notação funcional de proteínas.

1) Explorando os bancos de dados secundários. Exemplos:

SWISS-PROT e TrEMBL

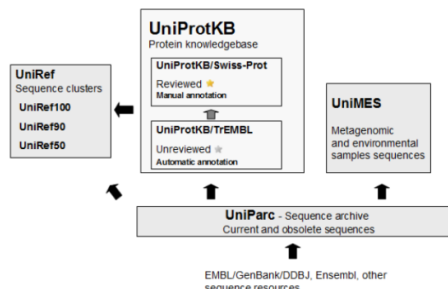


- SWISS-PROT foi criado em 1986 pelo Departamento de Bioquímica Médica da Universidade de Genebra e EMBL.
- Atualmente é mantido pelo Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) e EBI/EMBL.
- Este banco mantém um alto nível de anotações, como a descrição e a função da proteína, estrutura dos seus domínios, modificações pós-tradução, além de ter uma estrutura que facilita o acesso computacional a diferentes campos de informações.

Acesse: <http://us.expasy.org/sprot/>

- TrEMBL é um suplemento do SWISS-PROT que contém todas as traduções das entradas de sequências codificantes de nucleotídeos do EMBL.
- As entradas do TrEMBL são menos extensivamente notadas do que aquelas do SWISS-PROT, mas são movidas para o SWISS-PROT assim que uma notação confiável seja disponível.

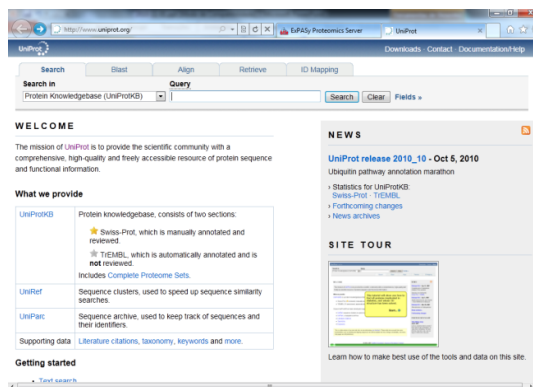
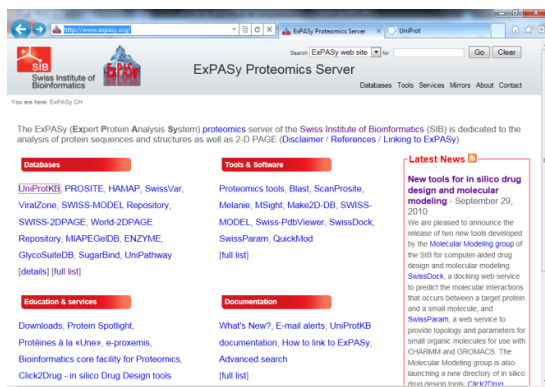
Acesse: <http://www.expasy.org/>



É uma colaboração entre o Instituto Europeu de Bioinformática (EBI), o Instituto Suíço de Bioinformática (SIB) e o Protein Information Resource (PIR).

As bases de dados do UniProt são Knowledgebase UniProt (**UniProtKB**), o UniProt Reference Clusters (**UniRef**), e o UniProt Archive (**UniParc**).

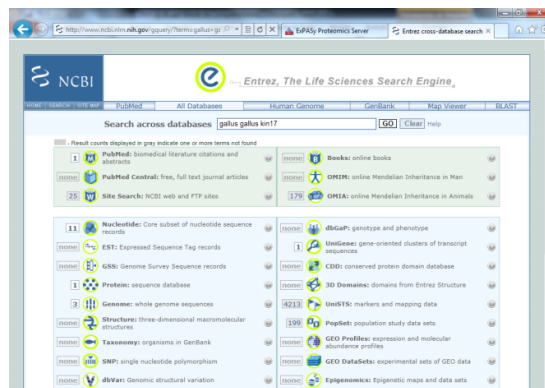
O banco de dados UniProt Metagenomic and Environmental Sequences (**UniMES**) é um repositório de dados desenvolvido especificamente para metagenômica e dados ambientais.



Acesse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>



O National Center for Biotechnology Information (**NCBI**) foi fundado em 1988 e é parte da United States National Library of Medicine (**NLM**), uma filial do National Institutes of Health (**NIH**) e está localizado em Bethesda, Maryland, USA



Tutorial 1

Problematização: Você sequenciou o gene de uma proteína a partir do cDNA. Agora deseja descobrir a sequencia de aminoácidos desta proteína, sua função e propriedades.

Ferramentas: Swiss tools / **Translate**

UniprotKB / **Blast**

Exercício1:

- 1) Busque nas bases de dados UniprotKB e NCBI as seqüências da proteína human HMGB1 ou outras de seu interesse (Blast) (exemplos: HIV protease).
- 2) Copie e cole as seqüências no formato FASTA usando o WordPad.
- 3) Alinhe as sequências usando o UniprotKB/**Alignment**
- 4) Explore as similaridades entre elas selecionando as propriedades dos aminoácidos.

Tutorial 2. Explorando as ferramentas de bioinformática proteomica do expasy.

Exercício 2:

Usando a ferramenta expasy/**ProtParam**, insira o código da sequência da proteína encontrada no SwissProt, ou copie e cole a sequencia da proteína encontrada no NCBI (formato Fasta).

- 1) Analise os parâmetros físico-químicos encontrados e discuta com seus colegas o significado de cada um deles.

Questões aplicadas:

- 1) Considerando que

$$Abs = \varepsilon.d.c$$

qual seria a concentração molar de uma solução estoque de HMGB1 purificada? Considere que 10 microlitros da solução estoque foram diluídos em 1000 microlitros de tampão, cuja mistura forneceu uma Abs de 0,013.

- 2) Como a HMGB1 estaria carregada em uma solução de pH 7,0?

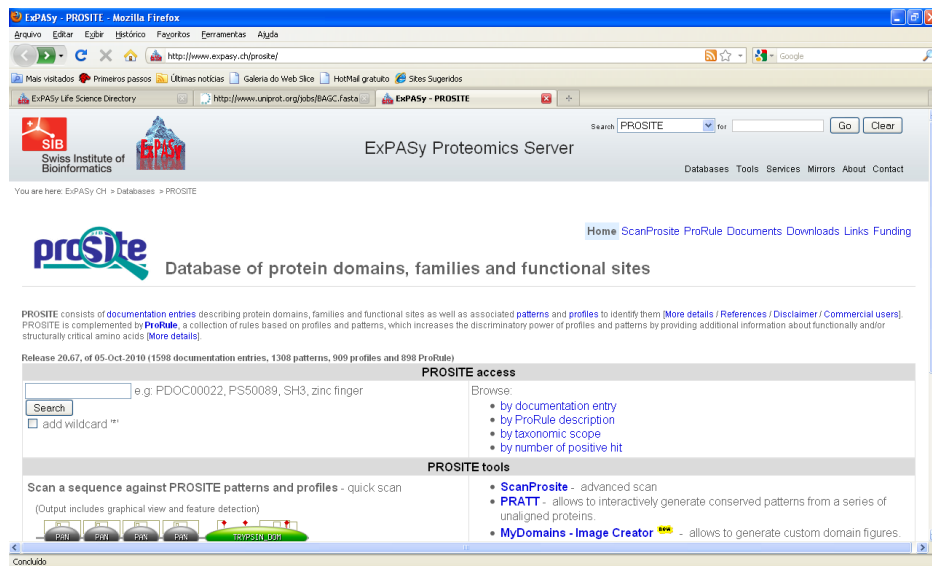
Exercício 3:

Objetivo: Identificar a família, domínios e subdomínios da proteína.

- 1) Usando a ferramenta expasy/**InterPro Scan**, insira a sequência da proteína de interesse no formato Fasta.
- 2) Analise os parâmetros fornecidos e discuta com seus colegas o significado de cada um deles a partir da probabilidade encontrada.

Exercício 4:

Objetivo: Identificar a família da proteína e seus sítios funcionais.



- 1) Usando a ferramenta expasy/**PROSITE**, insira a sequência da proteína de interesse no formato Fasta.
- 2) A qual família pertence sua proteína?

Exercício 5:

Objetivo: Identificar a localização celular da proteína.

- 1) Usando as ferramentas expasy/**PSORT** (para bactérias e archaea) ou **TargetP** (para outros organismos), insira a sequência da proteína de interesse no formato Fasta.
- 2) Analise os parâmetros fornecidos e discuta com seus colegas o significado de cada um deles.

Exercício 6:

Objetivo: Prever o padrão de enovelamento (folding) da estrutura secundária a partir da sequência de aminoácidos.

- 1) Usando as ferramentas expasy/**GOR** e expasy/**Jpred** insira a sequência da proteína de interesse no formato Fasta. Interprete os resultados.
- 2) Discuta como estes resultados poderiam ser utilizados na comparação de estruturas.

Exercício 7:

Objetivo: Colorir a sequência de aminoácidos de acordo com seu interesse.

- 1) Usando as ferramentas expasy/**Protein Colourer**, insira a sequência da proteína de interesse no formato Fasta e depois selecione os aminoácidos que deseja colorir.
- 2) Qual a finalidade deste procedimento?



BRENDA é o principal banco de dados de dados funcionais de enzimas, disponível para a comunidade científica.

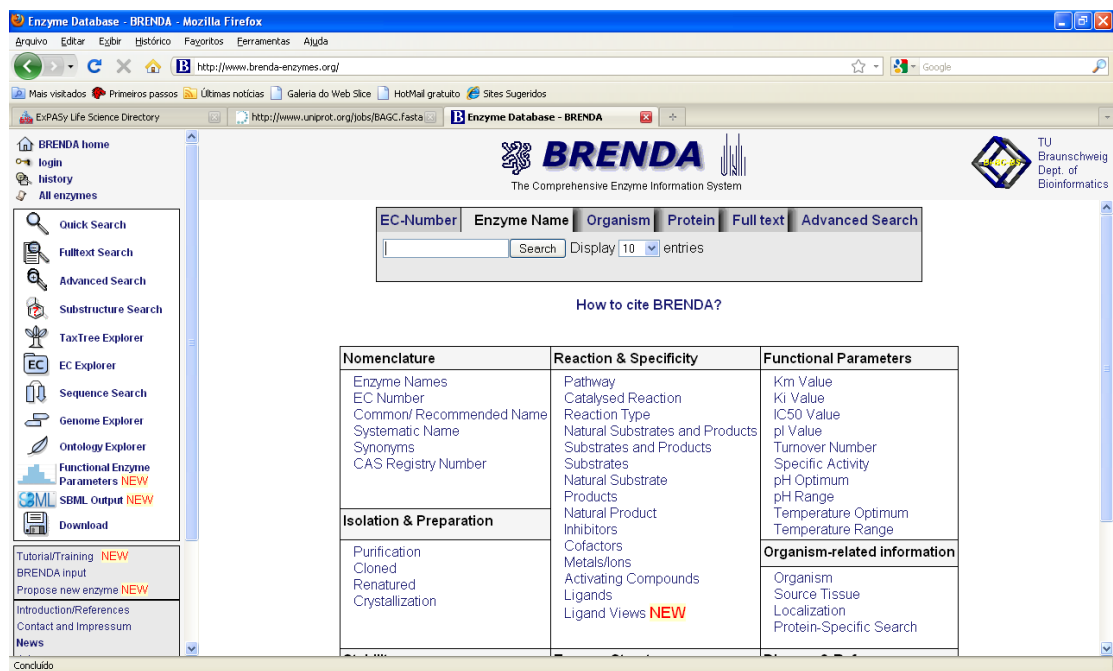
Possui um acervo com mais de 5.000 enzimas diferentes.

É mantido e desenvolvido pelo **Instituto de Bioquímica e Bioinformática** da Universidade Técnica de Braunschweig, na Alemanha.

É um repositório de dados sobre a função da enzima são extraídos diretamente da literatura primária por cientistas formados em Biologia ou Química.

As verificações de forma e consistência são feitas por programas de computador. Cada conjunto de dados sobre uma enzima classificada é verificado manualmente por pelo menos um biólogo e um químico.

Acesse: <http://www.brenda-enzymes.org>



Exercício 8:

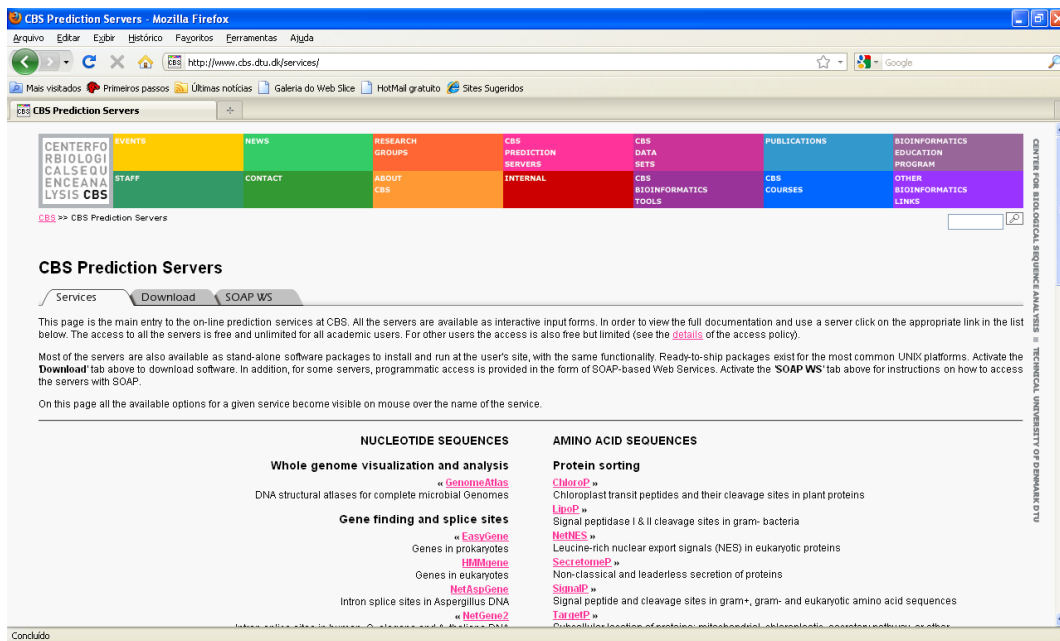
- 1) Buscar o *E.C.*, o K_M , o *pH ótimo* e *temperatura ideal* da catalase bovina (*Bos taurus*) e de fungo (*Aspergillus. agaricus*), na sua forma livre.
- 2) Busque estas informações para outras enzimas de seu interesse.

FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA NÃO VINCULADAS A REPOSITÓRIOS:

Acesse: <http://www.cbs.dtu.dk/services/>



O Center for Biological Sequence Analysis (CBS) na Universidade Técnica da Dinamarca foi fundado em 1993 e realiza pesquisas básicas no campo da bioinformática e de sistemas biológicos.



Exercício 9:

Objetivo: Predizer o Pepel celular, a Classe enzimática e a Categoria ontologica do gene a partir de uma sequência de aminoácidos.

Método: Utilizar o CBS/**ProtFun 2.2 server** para produzir predições *ab initio* da função da proteína a partir de sua sequencia.

- 1) Usando a ferramenta **ProtFun**, insira a sequência da proteína de interesse no formato Fasta.
- 2) Analise os parâmetros fornecidos e discuta com seus colegas o significado de cada um deles a partir da probabilidade encontrada.

Exercício 10:

Objetivo: Utilizar a ferramenta CBS/**TMHMM** para predizer a posição da proteína em relação à membrana.

Tutorial 2: Modelagem molecular por homologia.

A modelagem de uma proteína (proteína-problema) pelo método da homologia baseia-se no conceito de evolução molecular. Isto é, parte-se do princípio de que a semelhança entre as estruturas primárias desta proteína e de proteínas homólogas de estruturas tridimensionais conhecidas

(proteínas-molde) implica em similaridade estrutural entre elas. Os métodos correntes de modelagem de proteínas por homologia implicam basicamente em quatro passos sucessivos (Santos Filho & Alencastro, 2003):

- a) identificação e seleção de proteínas-molde;
- b) alinhamento das sequências de resíduos;
- c) construção das coordenadas do modelo;
- d) validação.

Exercício 11:

Objetivo: Predizer a estrutura 3D de uma proteína a partir de sua sequência de aminoácidos.

- 1) Utilizando a ferramenta CBS/**CPHmodels**, insira a sequência de aminoácidos da proteína de seu interesse para ser modelada.

Protein structure from sequence: distance constraints

Exercício 12: Validação do modelo:

Problematização: O modelo gerado por homologia pode conter erros estereoquímicos, e, portanto, precisa ser validado antes de ser analisado e utilizado em futuros estudos.

Objetivo: Utilizar os servidores de validação para checar a qualidade estereoquímica do modelo:

Lista de servidores de validação: <http://xray.bmc.uu.se/embo2001/modval/links.html>

Acesse VADAR: <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/vadar/>

OUTROS REPOSITÓRIOS DE DADOS RELACIONADOS A PROTEÔMICA:

BANCO DE DADOS DE ESTRUTURAS 3D

O **Protein Data Bank (PDB)** é o único repositório de informações em todo o mundo sobre as estruturas 3D de macromoléculas biológicas, incluindo as proteínas e ácidos nucleicos. A seguir, veremos um breve histórico desta importante base de dados:

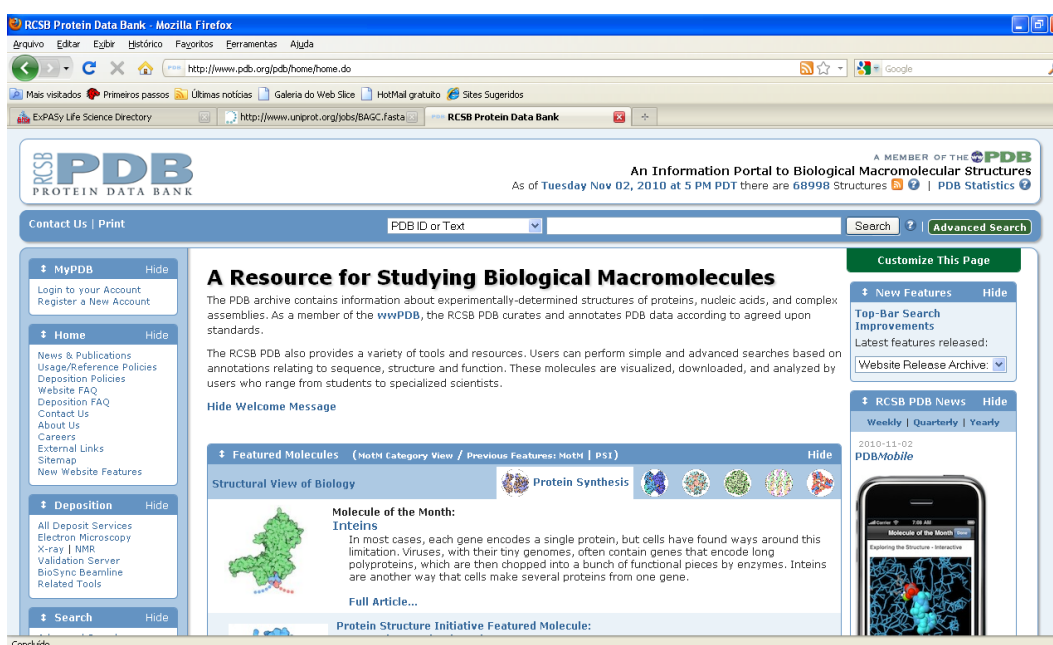
1971 – Início do PDB no Brookhaven National Laboratory com 7 estruturas.

1998 – O Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) se tornou responsável pela manutenção do PDB.

2010 – o RCSB PDB é membro do [wwPDB](#), um esforço colaborativo do [PDBe](#) (UK), [PDBj](#) (Japão), and [BMRB](#) (USA) para assegurar que o arquivo PDB seja global e uniforme.

Este banco de dados, somente aceita depósito de estruturas determinadas experimentalmente por Cristalografia de raios-X, NMR ou Microscopia eletrônica.

Acesse: <http://www.pdb.org>



Exercício 13:

Procure a estrutura de sua proteína (ou relacionadas) utilizando a ferramenta **Advanced Search, Macromolecule name** (HMGB1) ou baixe uma estrutura pelo identificador (pdbid): 1KD2 e 1HVC. Explore a estrutura utilizando o visualizador Jmol.

BANCO DE DADOS DE PRODUTOS QUÍMICOS (SMALL MOLECULES)

Na medida em que a estrutura de pequenas moléculas oriundas de metabolismo secundário de plantas, animais e microrganismos ou até mesmo por meio de síntese química vão sendo encontrados e suas estruturas químicas vão sendo definidas, elas são depositadas em bases de dados específicas, e podem ser utilizadas para pesquisa de novos fármacos com ações biológicas sobre

proteínas específicas. A ferramenta de bioinformática relacionada a esta área da proteômica é chamada de varredura virtual “virtual screening”.

Abaixo está uma lista de alguns dos principais repositórios de pequenas moléculas:

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Maybridge: <http://www.maybridge.com>

National Cancer Institute: htc.wustl.edu/library/NCI/1400.html

MDL Mentor: <http://mentor.library.wisc.edu/>

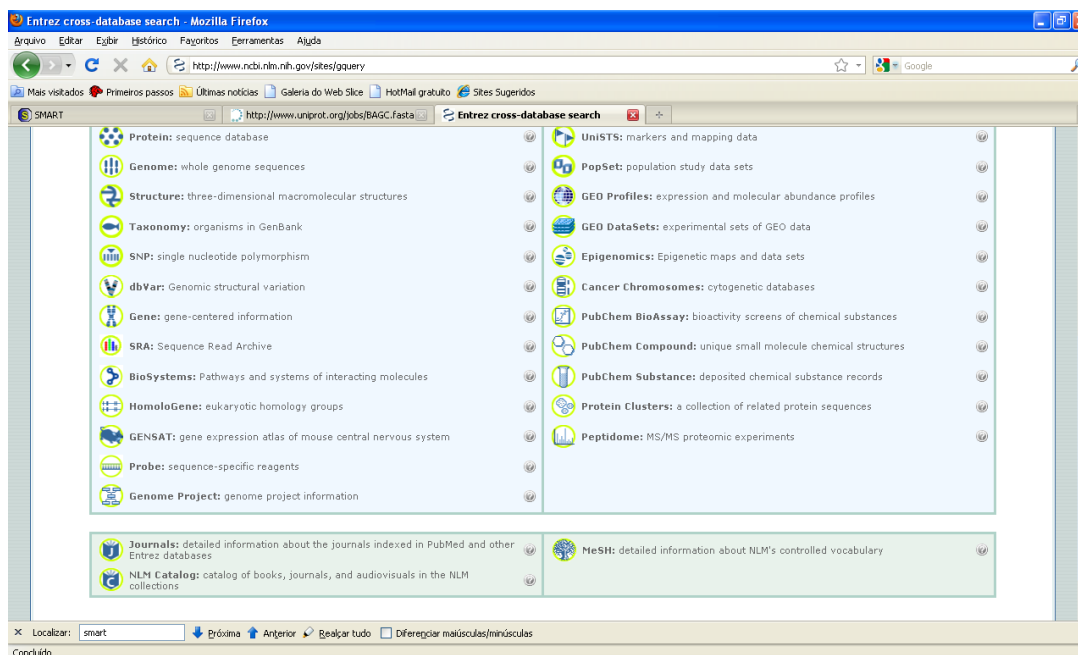
Chemistry Library (UW-Madison): <http://chemistry.library.wisc.edu/resources/>

Exercício 14:

Objetivo: Explorar a base de dados **pubchem** na procura de candidatos a inibidores da HIV protease.

Inibidor mais conhecido: A79, A 76928 (CID 446148)

IUPAC: (2S)-N-[(2S,3S,4S,5S)-3,4-dihydroxy-5-[[[(2S)-3-methyl-2-[[methyl(pyridin-2-ylmethyl)carbamoyl]amino]butanoyl]amino]-1,6-diphenylhexan-2-yl]-3-methyl-2-[[methyl(pyridin-2-ylmethyl)carbamoyl]amino]butanamide



Exercícios Aplicados:

Exercício 15:

Você isolou uma proteína a partir de células em cultura infectadas com um retrovírus desconhecido. Após o sequenciamento de aminoácidos, você obteve o seguinte resultado:

>NEWP

```
PQITLWQRPLVTIRIGGQLKEVLLDTGADDTVLEEMNLPGWKPKMIGGIGGFIKVRQYDQILIEICGHKAI  
GTVLVGPTPVNIIGRNLLTQIGCTLNFGSSGPQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMSLPG  
RWKPKMIGGIGGFIKVRQYDQILIEICGHKVIKTVLVGPTPVNIIGRNLLTQIGCTLNF
```

Objetivos:

- 1) Descobrir se a proteína é do vírus ou foi produzida pela célula em resposta a infecção.
- 2) Descobrir se a proteína é inédita (nova).
- 3) Decobrir qual a função (família) desta proteína.
- 4) Predizer sua estrutura terciária/quaternária por modelagem por homologia.

Métodos:

- 2) Descobrir se a proteína é inédita (nova).
Ferramenta: Alinhamento Blast (expasy/**UniprotKB**)
- 3) Descobrir qual a função (família) desta proteína.
Ferramenta: Prot Fun (at CBS Prediction Server)

O output desta ferramenta irá sugerir se a proteína pertence ao vírus ou a célula hospedeira

- 4) Predizer sua estrutura terciária por modelagem por homologia.
Ferramenta: CPHmodels (at CBS Prediction Server)

Salvar o resultado (query.pdb)

Observação: CPHmodels 3.0 é um servidor para modelagem de proteína por homologia, porém, não é o ideal. O reconhecimento do alvo (template) é baseado nos perfis de alinhamento, guiado pela predição de exposição de estrutura terciária.

- 5) Validação do modelo gerado.
Ferramenta: VADAR: <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/vadar/>

TUTORIAL 3

Objetivo: Identificar possíveis Motivos (Motif) estruturais na proteína.

Ferramenta: **Hyts Motif Scan**

Faz varreduras nos bancos de dados de motivos

Acesse: http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan

TUTORIAL 4

Problematização: Você descobriu que sua proteína foi produzida pelo vírus. Agora deseja descobrir se os inibidores de proteases antivirais podem ter alguma chance de se ligar a esta proteína.

Objetivo: Fazer docagem “docking” da proteína modelada com as principais drogas antivirais conhecidas.

Método:

Ferramenta: **Patchdock server** (at <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>)

Inputs:

Receptor: query.pdb Ligand: ligand.pdb

Docking – Ferramenta de “Drug discovery”

<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>

PatchDock Server: An Automatic Server for Molecular Docking - Windows Internet Explorer

<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Favorites PatchDock Server: An Automatic Server for Molecular ...

Página Segurança Ferramentas

PATCHDOCK

Molecular Docking Algorithm Based on Shape Complementarity Principles

[\[About PatchDock\]](#) [\[Web Server\]](#) [\[Download\]](#) [\[Help\]](#) [\[FAQ\]](#) [\[References\]](#)

Type PDB codes of receptor and ligand molecules or upload files in PDB format

Receptor Molecule: (PDB:chainId e.g. 2kai:AB) or upload file: Procurar...

Ligand Molecule: (PDB:chainId e.g. 2kai:1) or upload file: Procurar...

e-mail address: (the results are sent to this address)

Clustering RMSD:

Complex Type:

Advanced Options: [\[Show\]](#) [\[Hide\]](#)

Be sure to give receptor and ligand in the corresponding order!

FireDock - Fast Interaction Refinement in Molecular Docking

Internet 100%

Os resultados são enviados por e-mail

OBS: Os resultados mais prováveis são apresentados em ordem de melhor ajuste

Visualização de macromoléculas em 3D:

Utilizar o **Jmol** para visualizar as estruturas

Download at: <http://jmol.sourceforge.net/download/>

REFERÊNCIAS:

HOCK R, FURUSAWA T, UEDA T, BUSTIN M. HMG chromosomal proteins in development and disease. Trends Cell Biol. 2007 Feb;17(2):72-9. Epub 2006 Dec 13. Review.

LEACH AR. Molecular modeling: Principles and applications. 2nd ed. Prentice Hall, 2001, 784 p.
NELSON DL, COX MM. Lehninger princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier, 2007 1202 p.

PAULL TT, HAYKINSON MJ, JOHNSON RC. The nonspecific DNA-binding and -bending proteins HMG1 and HMG2 promote the assembly of complex nucleoprotein structures. Genes Dev. 1993 Aug;7(8):1521-34.

REHM H. Protein Biochemistry and proteomics. London:Elsevier, 2006, 236 p.

SANTOS FILHO AO, ALENCASTRO RB. Modelagem de proteínas por homologia. Quím. Nova, v. 26 n. 2, 2003.

SHEFLIN LG, SPAULDING SW. High mobility group protein 1 preferentially conserves torsion in negatively supercoiled DNA. Biochemistry. 1989 Jun 27;28(13):5658-64.

THOMAS JO, TRAVERS AA. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. Trends Biochem Sci. 2001 Mar;26(3):167-74. Review. Erratum in: Trends Biochem Sci 2001 Apr;26(4):219.

UGRINOVA I, MITKOVA E, MOSKALENKO C, PASHEV I, PASHEVA E. DNA bending versus DNA end joining activity of HMGB1 protein is modulated in vitro by acetylation. Biochemistry. 2007 Feb 27;46(8):2111-7. Epub 2007 Feb 1.

YANG H, WANG H, TRACEY KJ. HMG-1 rediscovered as a cytokine. Shock. 2001 Apr;15(4):247-53. Review.

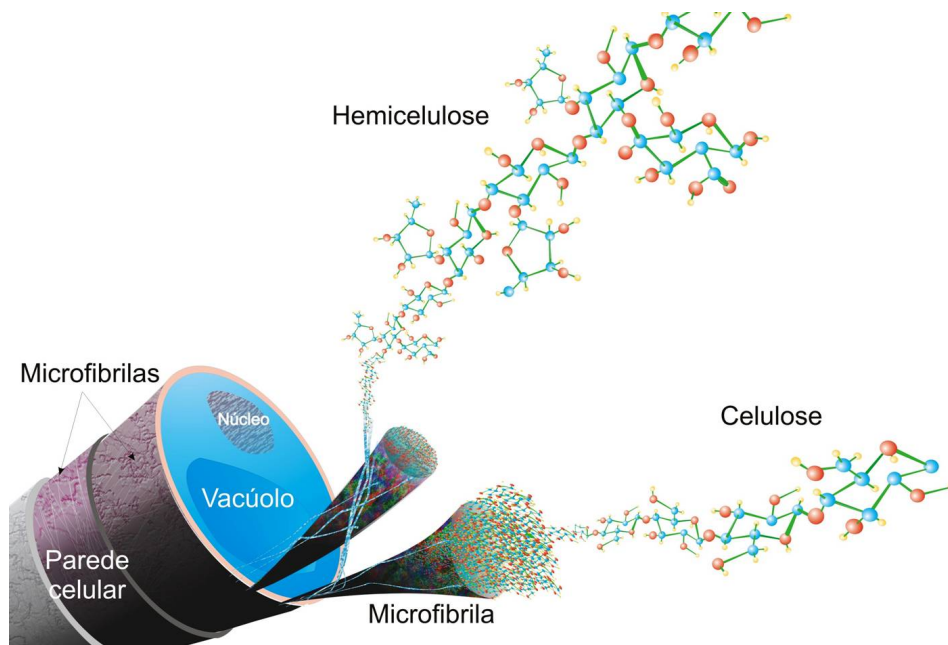
YE SQ. Bioinformatics a practical approach. London:Chapman & Hall/CRC, 2008, 618.

DESAFIOS DA BIOENERGIA: “DESCONSTRUINDO” A PAREDE CELULAR

Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho
Maria de Lourdes Lúcio Ferrarese
Wanderley Dantas dos Santos
Graciene de Souza Bido
Aline Finger Teixeira
Ana Paula Ferro
Gisele Adriana Bubna de Souza
Flávia Carolina Moreira
Adriana Ita Gremes

INTRODUÇÃO

Após o surgimento da parede celular as plantas desenvolveram rigidez, hidrofobicidade e melhoria da condução necessária para viver em ambiente terrestre (Boerjan et al., 2003). A parede celular, em geral, é formada por uma combinação de polímeros e, entre eles, os polissacarídeos representam a maior parte (80-90%) e estão distribuídos em três classes: celulose, hemiceluloses e pectinas (Buckeridge, 2006).



A lignina e a celulose formam a lignocelulose, que compõe quase a totalidade dos rejeitos de plantas utilizados como matéria-prima pela indústria, como o bagaço e a palha. O potencial da biomassa como matéria-prima é ainda mais contundente se for considerado outras lavouras nacionais como a soja, milho, trigo, arroz e aveia (Souza e Macedo, 2010).

A celulose, principal componente da biomassa, é formada por uma cadeia linear de

moléculas de glicose ligadas entre si. Estas ligações químicas guardam energia livre e podem ser quebradas para liberar açúcares fermentáveis. Entretanto, a celulose é muito bem protegida pelas plantas, a fim de que não sejam facilmente utilizadas por predadores. Portanto, o rendimento líquido da conversão da celulose em glicose livre, e a seguir em etanol, é pouco eficiente com as tecnologias disponíveis. Tornar os rendimentos favoráveis possibilitará o melhor aproveitamento dessa rica matéria prima natural encontrada não só no bagaço da cana, mas em outras fontes de biomassa vegetal (serragens, palhadas, cascas) atualmente desperdiçadas ou subutilizadas (Buckeridge et al., 2010).

O desmonte bioquímico da parede celular tem sido proposto como alternativa para tornar viável o uso dos polissacarídeos como fonte de açúcares fermentáveis. No entanto, este processo deve preservar intactos os monossacarídeos que serão usados para a fermentação. O desenvolvimento de tecnologias capazes de desmontar a parede celular vegetal requer o aprofundamento do nosso conhecimento sobre a lignina, a via que leva à sua síntese e sobre a organização da rede de polímeros que constitui a parede celular. As propriedades físicas e biológicas da parede celular de tecidos e órgãos das plantas podem ser modificadas para uso industrial ou alimentar.

Depois da celulose, o polímero em maior quantidade das paredes celulares é a lignina (Polle et al., 1994). Ela possui alto impacto na digestibilidade de plantas forrageiras, na indústria de papel e de biocombustível. O estudo atual da lignina está envolvido na busca da redução de seu conteúdo, com o intuito de melhorar a produção de biocombustível a partir da celulose (Li et al., 2008).

A lignina é um polímero de constituição difícil de ser estabelecida, devido à complexidade de sua formação, as modificações estruturais durante seu isolamento das paredes celulares, a variação na sua composição monomérica e as ligações covalentes entre a parede celular e outros compostos (carboidratos, proteínas, compostos fenólicos). Dado que a deposição e composição da lignina podem variar com a camada, o tipo de parede celular e com a espécie (Anterola et al., 2002), vários métodos têm sido aplicados para estudá-la de forma complementar. Muito do conhecimento sobre sua estrutura, inclui os métodos de quantificação total e as estimativas dos componentes monoméricos (Micic et al., 2002).

A lignina é formada por uma mistura racêmica de heterobiopolímeros aromáticos, composto principalmente, de três hidroxicinamil álcoois (*p*-cumaril, coniferil e sinapil) diferindo no seu grau de metoxilação. Eles correspondem às unidades monoméricas *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil (H, G e S, respectivamente) (Li et al., 2008). Entretanto, além de seus componentes básicos, a lignina apresenta outros componentes, que embora presentes em menor quantidade, são igualmente importantes para a determinação das propriedades e funções desse polímero.

Várias enzimas estão envolvidas na síntese de lignina, sendo a sequência metabólica que conduz a esse processo conhecida como via de fenilpropenóides, descrita, simplificada, na figura 1.

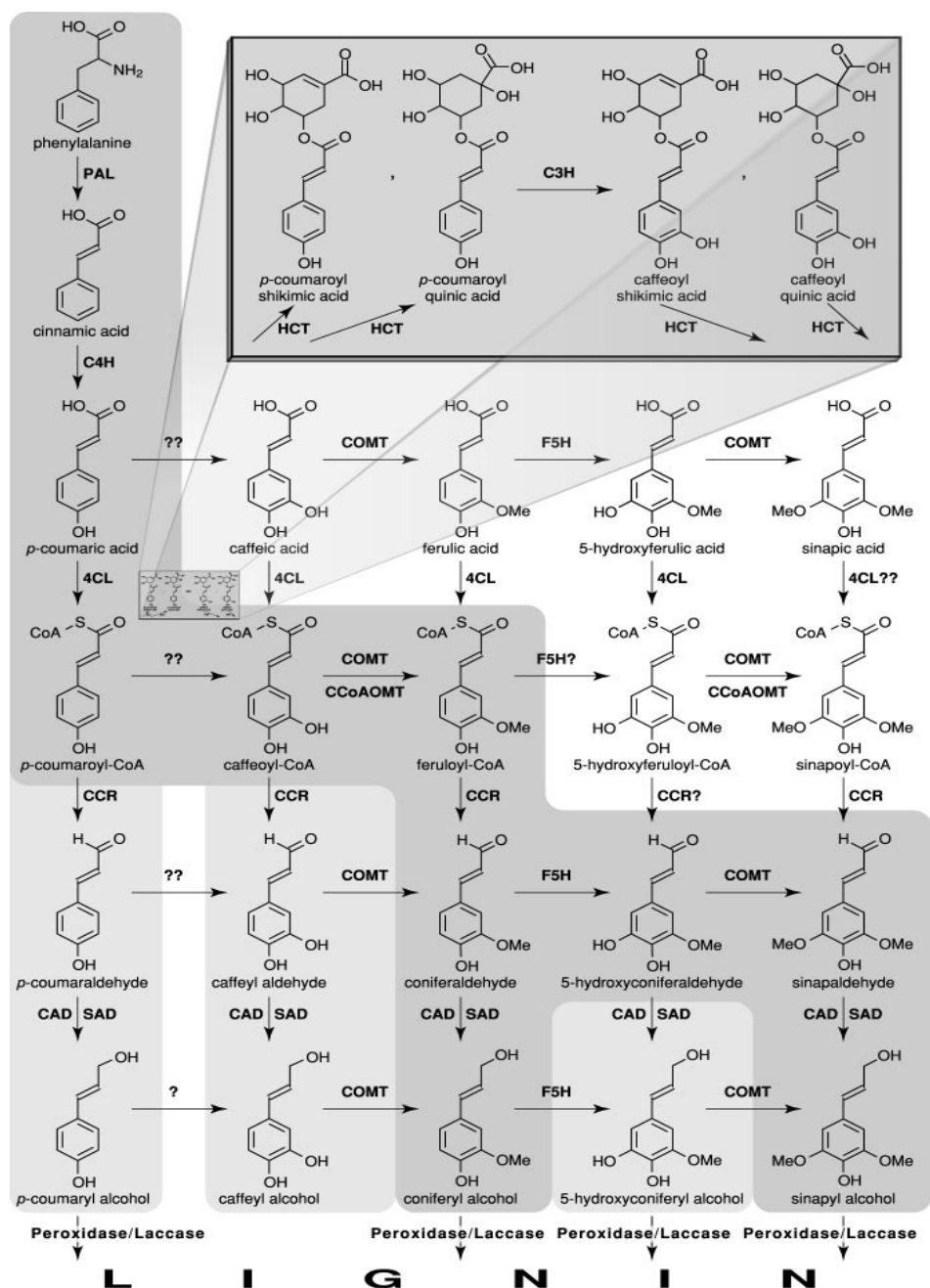
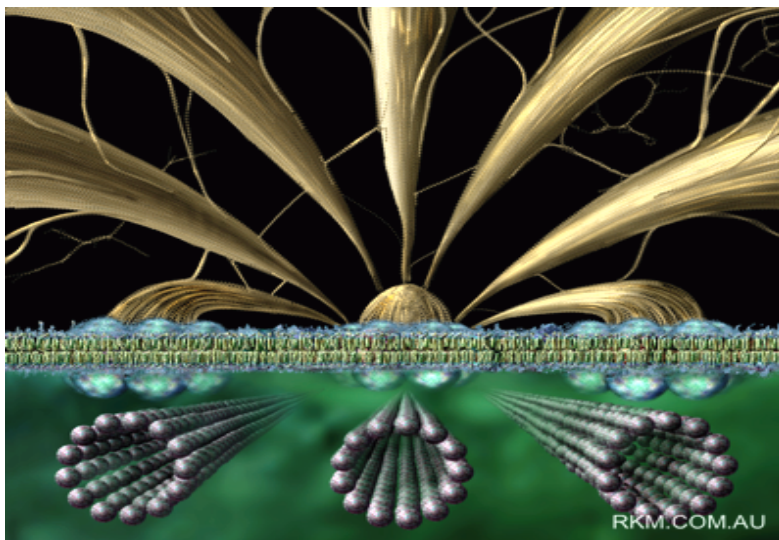


Fig. 1. Via dos fenilpropenóides e biossíntese da lignina baseada em análises composicionais, ensaios enzimáticos e o uso de plantas transgênicas. (**PAL**, fenilalanina amônia liase, **C4H**, cinamato 4-hidroxilase, **4-CL**, 4-cumarato:CoA-ligase, **HCT**, hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato transferase, **C3H**, *p*-cumaroilchiquimato/quinato 3'-hidroxilase, **CCoAOMT**, cafeoil-CoA *O*-metiltransferase, **CCR**, cinamoil-CoA redutase, **F5H**, ferulato-5-hidroxilase, **COMT**, ácido cafeico *O*-metiltransferase, **CAD**, cinamil álcool desidrogenase, **SAD**, sinapil álcool desidrogenase).

A primeira reação da via dos fenilpropanóides é catalisada pela fenilalanina amônia liase (PAL), que converte L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico. Esse, apesar de não ser ainda um composto fenólico, é precursor imediato dos mesmos (Jones, 1984). A 4-cumarato:CoA ligase (4-CL) catalisa a formação de tioésteres CoA dos ácidos cinâmico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e 5-hidroxiferúlico. Outra etapa na via de síntese de fenilpropanóides de grande importância no desenvolvimento de plantas é a que gera fenólicos precursores para a síntese e deposição de lignina na parede celular. Esses precursores são relatados por Hahlbrock e Scheel (1989) como sendo monômeros de álcoois cinâmílicos, hidroxilados e metoxilados, que são sintetizados em dois passos pela cinamoil-CoA redutase (CCR) e cinamil álcool desidrogenase (CAD).

OBJETIVOS

1. Compreender a arquitetura e as propriedades da parede celular vegetal, bem como sua complexidade e diversidade;
2. Relacionar a via dos fenilpropanóides com os processos bioenergéticos;
3. Quantificar o conteúdo de lignina total e sua composição monomérica, determinando a proporção dos principais monômeros (*p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil);
4. Evidenciar o material lignocelulósico como fonte de matéria-prima para produção de biocombustível.



As celulose sintases são proteínas transmembrana que se agrupam em grupos chamados rosetas. A região citoplasmática das rosetas se conecta a microtúbulos dispostos junto à membrana que as orientam. Infoográfico Plant Cell Wall[®] foi gentilmente cedido

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultivo e preparação das plântulas

As plantas de **cana-de-açúcar** (*Saccharum officinarum*) serão cultivadas a partir de toletes. Os quais serão colocados em bandeja com água e areia para enraizamento. Após 15 dias, as plantas viáveis serão transferidas para vasos e cultivadas em casa de vegetação.

Sementes de **milho** (*Zea mays*) e/ou **soja** (*Glycine max*) serão esterilizadas com 2% hipoclorito de sódio por 5 min, lavadas com água, postas a germinar no escuro, a 25°C, entre folhas de papéis Germitest CEL-060. Após três dias, vinte e cinco plântulas serão cultivadas em hidroponia. Elas serão suspensas em uma placa de acrílico perfurada e transferidas para um recipiente de vidro (10 × 16 cm) contendo 200 ml de solução nutritiva, pH 6,0. O recipiente será mantido em câmara de crescimento (25°C, 12/12 h fotoperíodo luz/escuro, irradiância de 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 24 h.

As plantas serão transferidas para estufa, na qual permanecerão a 60°C para obtenção da biomassa seca, que será utilizada para as análises de lignina e monômeros de lignina.

2. Preparação da parede celular

Tecidos secos (0,3 g), serão homogeneizadas em 50 mM tampão fosfato pH 7,0 (7 ml) e transferidos para um tubo de centrífuga (Ferrarese et al., 2002). O precipitado será centrifugado (1.400×g, 6 min), lavado e centrifugado sucessivamente como segue: mais 2 vezes com 50 mM tampão fosfato pH 7,0 (7 ml); 3 vezes com 1% (v/v) Triton[®] X-100 em tampão pH 7,0 (7 ml); 2 vezes com 1 M NaCl em tampão pH 7,0 (7 ml); 2 vezes com água destilada (7 ml) e 2 vezes com acetona (5 ml). O material será seco em estufa (80°C, 24 h) e a massa definida como a fração da parede celular livre de proteínas.

3. Quantificação de lignina

A parede celular livre de proteínas será usada para a determinação do teor total de lignina pelo método da lignina solúvel em brometo de acetila (Morrison, 1972). Uma porção (20 mg) do material será acondicionada em tubo de centrífuga e 500 μl de acetilbromida 25% serão acrescentados. As amostras serão aquecidas a 70°C, 30 min, transferidas para banho de gelo e a reação será interrompida com adição de 0,9 ml de NaOH 2 M. A seguir, serão adicionados 0,1 ml de hidroxilamina-HCl 7,5 M e 2 ml de ácido acético gelado. As amostras serão centrifugadas (1.000×g, 5 min), o sobrenadante diluído e usado para a realização das leituras em espectrofotômetro a 280 nm. A concentração de lignina será determinada de acordo com uma curva padrão e será expressa em mg lignina g^{-1} de parede celular.

4. Quantificação da composição monomérica da lignina

Para determinar a composição monomérica de lignina será usada a oxidação com nitrobenzeno (Dean, 1997). Uma fração da parede celular livre de proteínas (50 mg) será colocada em uma ampola Pyrex[®] contendo 1 ml de NaOH 2 M e 100 µl de nitrobenzeno. A ampola será selada e aquecida a 170°C por 2,5 h, com agitação na metade do tempo de reação. Após oxidação, a amostra será resfriada, lavada duas vezes com clorofórmio, acidificada com 350 µl de HCl 5 M e extraída duas vezes com clorofórmio. Os extratos orgânicos serão combinados, secos e ressuspensos em metanol. As amostras serão filtradas através de filtro de 0,45 µm (Hamilton[®] Co., Nevada, USA) e analisadas (20 µl) em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®] (Tóquio, Japão), equipado com uma bomba LC-10AD, um injetor Rheodyne[®], um detector UV SPD-10A, um módulo de comunicação CBM-101 e uma estação de sistema Class-CR10. Uma coluna de fase-reversa Shimpack[®] CLC-ODS (M) (150 × 4.6 mm, 5 µm) será usada a 30°C, com uma pré-coluna equivalente (10 × 4.6 mm). A coleta de dados e a integração serão realizados com o software Class-CR10 (Shimadzu[®], Tóquio, Japão). A fase móvel será metanol/ácido acético 4% em água (20/80, v/v), com fluxo de 1,0 ml min⁻¹ para corrida isocrática de 20 min. As quantificações de *p*-hidroxibenzaldeído, vanilina e siringaldeído serão realizadas a 290 nm utilizando os padrões correspondentes. Os resultados serão expressos como µg monômero mg⁻¹ de parede celular.

REFERÊNCIAS

- ANTEROLA A.M., JEON J-H., DAVIN L.B., LEWIS N.G. 2002. Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*. Factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. *J Biol Chem.* 277:18272–18280.
- BOERJAN W., RALPH J., BAUCHER M. 2003. Lignin biosynthesis. *Ann Rev Plant Biol.* 54:519-546.
- BUCKERIDGE M. S. 2006. Implications of emergence, degeneracy and redundancy for the modeling of the plant cell wall. In: Takahisa Hayashi. (Org.). *The Science and the Lore of the Plant Cell Wall: Biosynthesis, Structure and Function*. Boca Raton: BrownWalker Press. 41-47.
- BUCKERIDGE M.S., SOUZA A.P., DOS SANTOS W.D. 2010. Routes for Cellulosic Ethanol in Brazil. In: Luiz Augusto Barbosa Cortez. (Org.). *Sugarcane Bioethanol: R&D for productivity and sustainability*. Blucher. São Paulo.
- DEAN J.F.D. 1997. Lignin analysis. In: Dashek, W.V. (Ed.). *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. CRC Press. 199-215p.
- FERRARESE M.L.L., ZOTTIS A., FERRARESE-FILHO O. 2002. Protein-free lignin quantification in soybean (*Glycine max*) roots. *Biologia.* 57:541-543.
- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.40, p.347-369,

1989.

JONES, D.H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction and its role in plant development. *Phytochemistry*, v.23, p.1349-1359, 1984.

LI X., WENG J-K., CHAPPLE C. 2008. Improvement of biomass through lignin modification. *Plant J.* 54:569-581.

MICIC M., ORBULESCU J., RADOTIC K., JEREMIC M., SUI G., ZHENG Y., LEBLANC R.M. 2002. ZL-DHP lignin model compound at the air – water interface. *Biophys Chem.* 99:55-62.

MORRISON I.M. 1972. A semi-micro method for the determination of lignin and its use in predicting the digestibility of forage crops. *J Sci Fd Agric.* 23:455.

POLLE A., OTTER T., SEIFERT F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.* 106:53-60.

SOUZA E.L.L., MACEDO I.C. 2010. Etanol e bioeletricidade: A cana-de-açúcar na matriz energética brasileira. São Paulo, Luc Projetos de Comunicação. <<http://www.unica.com.br/multimedia/publicacao>>. Acesso em: 10 01 2011.

MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA DIFERENCIAR SOJA CONVENCIONAL DE SOJA TRANSGÊNICA

Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho
Rogério Marchiosi
Rita de Cássia Siqueira Soares
Angela Valderrama Parizotto
Paulo Alfredo Feitosa Bohm

INTRODUÇÃO

Glifosato [*N*-(phosphonometil) glicina] é um herbicida amplamente utilizado na agricultura para o controle plantas daninhas (Franz et al., 1997). Ele inibe a síntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) em plantas e microrganismos (Fisher et al., 1986; Jaworski, 1972). O glifosato foi um dos primeiros herbicidas, comercialmente relevante, em que se caracterizou a ação sobre uma única enzima, não existente em animais. Seu mecanismo de ação é bem definido já que inibe especificamente a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase, E.C. 2.5.1.19), que catalisa a condensação do chiquimato-3-fosfato com fosfoenolpiruvato (Steinrucken e Amrhein, 1980). Esta etapa está inserida na via do chiquimato que precede a via biossintética de aminoácidos aromáticos e derivados como IAA, vitaminas E, K e ácido fólico, ubiquinonas, antocianinas, fitoalexinas, flavonóides, fenilpropanóides e lignina, como mostrado na Figura 1. O glifosato causa inibição competitiva em relação ao fosfoenolpiruvato (PEP) e incompetitiva em relação ao chiquimato 3-fosfato (S3P), indicando a formação do complexo ternário EPSPS-S3P-glifosato. A formação deste complexo é um processo de equilíbrio de modo que o acúmulo do S3P, provocado pela obstrução da via, propicia a formação do complexo binário EPSPS-S3P, que é a forma preferencial para a ligação do glifosato, aumentando a velocidade de associação em cerca de 80.000 vezes (Franz et al., 1997).

Pelo fato de se tratar de um herbicida não-seletivo, o glifosato pode afetar, também, as plantas cultivadas. Aspergido nas folhas, o glifosato possui ação sistêmica dentro da planta, sendo rapidamente translocado para as raízes (Duke, 1988). De fato, em plantas susceptíveis como a soja (*Glycine max* L. Merr.) o glifosato não é significativamente metabolizado e, deste modo, tende a se acumular em regiões de alta atividade metabólica como os nódulos (Reddy e Zablotowicz, 2003) e os tecidos meristemáticos (Kremer et al., 2005). Translocado preferencialmente pelo floema, o glifosato se acumula nas raízes em concentrações de até 0,3 mM. Sua liberação para a rizosfera é lenta e, pelo fato de não se movimentar no solo devido à rápida e alta taxa de adsorção, sofre a ação de microrganismos que o converte em ácido aminometilfosfônico (AMPA), seu principal metabólito (Torstensson e Hamissepp, 1977; Franz et al., 1997; Araújo et al., 2003; Galli e

Montezuma, 2005). Além do mais, dentre as inúmeras espécies de interesse econômico, a soja, tornou-se alvo da atenção dos cientistas no mundo por ter se tornado, nas últimas décadas, uma planta economicamente importante e com tendência para aumentar ainda mais esta importância no futuro.

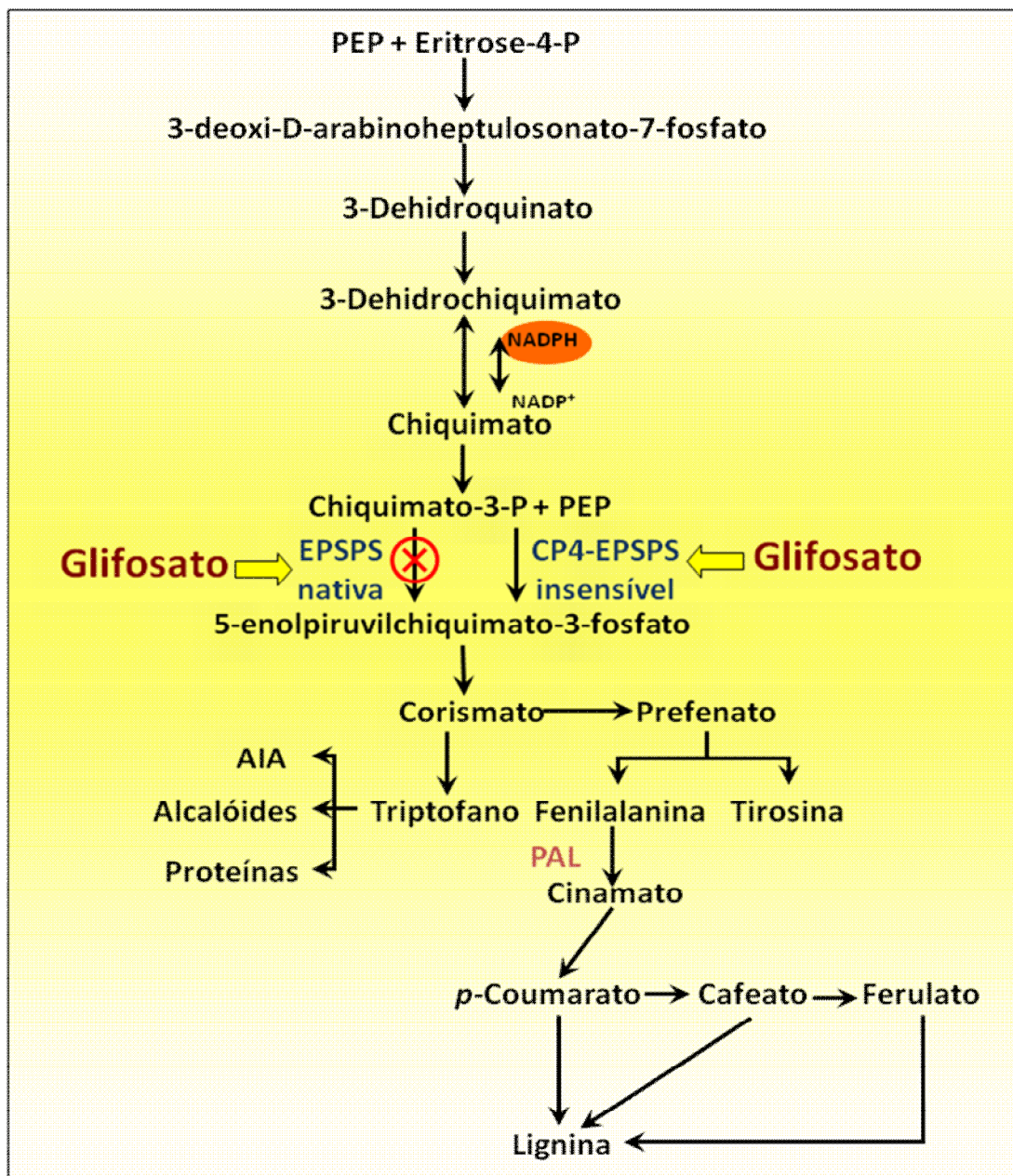


Figura 1. A via do chiquimato. O glifosato inibe uma enzima da via (EPSP sintase) com sérias consequências metabólicas para a planta como, por exemplo, a inibição da síntese dos três aminoácidos aromáticos e de outras moléculas relacionadas.

A soja resistente ao glifosato

É notório o esforço concentrado pela agricultura moderna na busca de aumento da produtividade utilizando cultivares com características de interesse do agricultor como a tolerância às doenças, insetos e herbicidas, obtidas pelo melhoramento genético. Algumas das características citadas anteriormente têm sido alcançadas por meio de tecnologia do DNA recombinante. No caso da soja RR (*Roundup®-resistant*) resistente ao glifosato a base da resistência ao herbicida é a inserção do gene CP4-EPSPS, clonado do *Agrobacterium sp*, linhagem CP4, em seu genoma (Padgett et al., 1995; Harrison et al., 1996) pelo método da biobalística (Kruse et al., 2000). Então, a soja transgênica codifica uma variante da EPSP sintase que possui baixa afinidade ao glifosato conferindo, a ela, tolerância a este herbicida (Fig. 2).

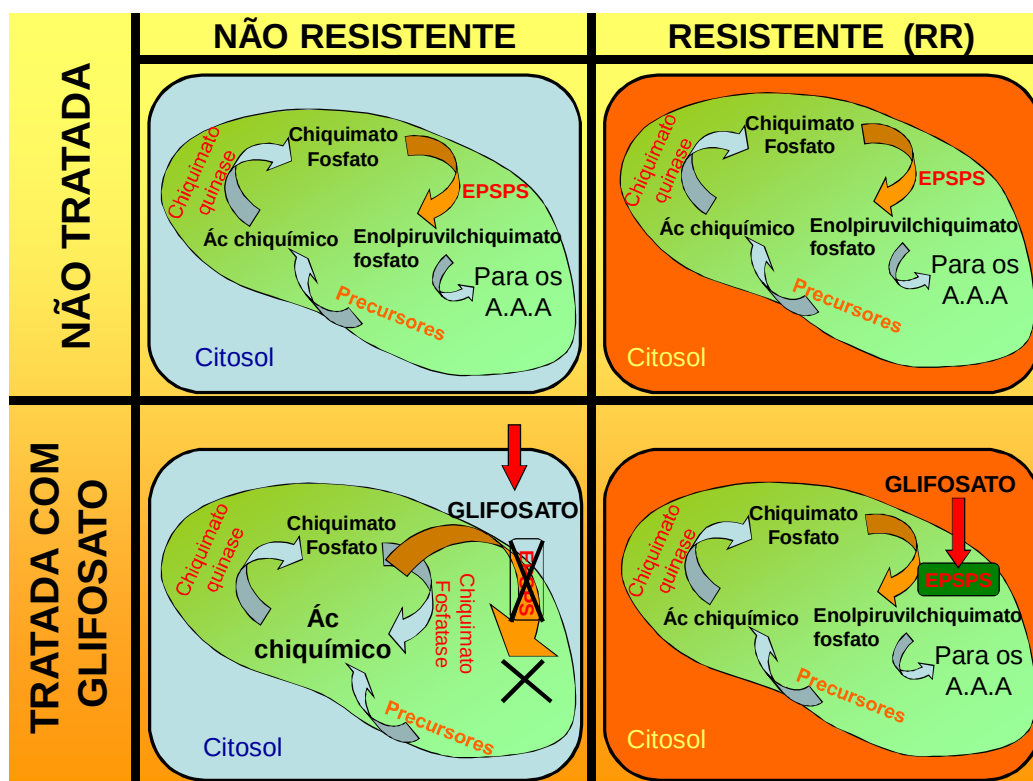


Figura 2. Modelo para a resistência ao glifosato na soja RR. A soja glifosato resistente possui uma EPSP sintase que é insensível ao glifosato e não é inibida na presença do herbicida.

A morte de uma planta não transgênica, injuriada, ocorre em alguns dias após a aplicação de glifosato. Entretanto, algumas alterações metabólicas podem ser identificadas em poucas horas. Dentre as alterações encontradas destaca-se o acúmulo do ácido chiquímico, o que pode se tornar útil na rápida detecção de tecidos vegetais afetados (Franz et al., 1997; Duke et al., 2003; Kremer et al., 2005). Fato digno de nota são as constatações de Singh e Shaner (1998) de que cultivares de soja transgênica, capazes de expressar suficientemente o gene CP4-EPSPS, não acumulam ácido chiquímico quando tratadas com glifosato.

Contrariamente, a inibição da EPSP sintase pelo glifosato, nas cultivares convencionais, resulta no acúmulo de ácido chiquímico e de ácidos hidroxibenzóicos. O acúmulo destes ácidos foi comparado em plântulas de soja convencional, tratadas ou não com glifosato. De fato, os teores dos ácidos protocatecuico e gálico, nas plantas submetidas ao herbicida, foram maiores que naquelas não tratadas (Lydon and Duke, 1988; Becerril et al., 1989; Hernandez et al., 1999; Kremer et al., 2005). O acúmulo dos mencionados compostos é decorrente de reações reversíveis entre o ácido chiquímico-3-fosfato e o ácido desidrochiquímico (Fig. 1). Segundo María et al. (2006), a inibição da EPSP sintase desregula a via do chiquimato, resultando em um descontrole no fluxo de carbono e subsequente acúmulo massivo de ácido chiquímico e ácidos hidroxibenzóicos em determinadas regiões da planta tais como folhas e nódulos. Inibindo a via do chiquimato, glifosato também afeta as vias metabólicas subsequentes àquela do chiquimato, como é o caso das etapas que levam à formação dos ácidos fenólicos, precursores de lignina (Fig. 1).

Os efeitos tóxicos do glifosato podem ser atribuídos à (1) impossibilidade da planta de sintetizar os aminoácidos aromáticos e, possivelmente, os ácidos fenólicos e lignina; (2) um dreno de energia resultante de ATP e fosfoenolpiruvato gasto no acúmulo de ácido chiquímico, ácido heptulossômico-7-fosfato-3-desoxiarabinose e ácidos hidroxibenzóicos e (3) toxicidade dos intermediários acumulados na via do ácido chiquímico (Fisher et al., 1986).

Métodos de diferenciação de soja convencional e soja RR

Atualmente, vários métodos têm sido desenvolvidos com o objetivo de discriminar cultivares de soja resistente ao glifosato de cultivares convencionais. Dentre os métodos mais utilizados encontram-se os bioensaios, que avaliam diferenças fenotípicas das plântulas expostas ao herbicida, os testes de ELISA e os *kits*, que possibilitam a detecção de proteínas exclusivas das plantas transgênicas, e técnicas de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) que emite resultados qualitativos e quantitativos referentes à presença de sequências de DNA específicas nas plantas transgênicas.

Os bioensaios são testes de considerável importância devido à fácil execução, baixo custo, e por não necessitarem de equipamentos sofisticados. Essas são características desejáveis em um teste com esse objetivo. Entretanto, os bioensaios são testes que necessitam de um tempo relativamente longo para execução. Isso inviabiliza o uso desses métodos em Laboratórios de Análise de Sementes ou, por exemplo, em unidades de beneficiamento durante a checagem na recepção de sementes (Cunha et al., 2005).

A análise por PCR é uma técnica bastante sensível e confiável. Entretanto, requer equipamentos sofisticados e reagentes de alto custo, além de ser de difícil padronização, o que dificulta a repetibilidade dos resultados devido a variações causadas, principalmente, por

contaminações e calibração de equipamentos. Isso inviabiliza o uso dessa técnica em análises de rotina. Contudo, esta é ainda uma ferramenta importante no caso de um reteste quando houver dúvidas quanto à detecção de organismos geneticamente modificados por outras metodologias.

Os testes utilizando *kits* como o “Kit Trait Test” (teste com anticorpos específicos para a proteína CP4-EPSPS) são confiáveis, muito rápidos e de fácil manuseio. Entretanto, é de custo muito superior aos bioensaios e também não são recomendados no uso de rotina em um Laboratório de Análise de sementes.

Almejando apresentar soluções para os problemas de alto custo e da necessidade de rapidez, reprodutibilidade, de equipamentos sofisticados e de mão-de-obra especializada, em testes dessa natureza, o Laboratório de Bioquímica de Plantas (BIOPLAN) da Universidade Estadual de Maringá desenvolveu uma metodologia para diferenciar sementes de soja RR de sementes de soja convencional. A metodologia proposta possui um tempo de análise intermediário ao dos testes descritos anteriormente, é de alta confiabilidade, além de ser de fácil execução. Considerando que se tenha um cromatógrafo a metodologia é também muito barata, pois utiliza reagentes de custo muito baixo. Ela permite a discriminação das cultivares convencional e transgênica pela detecção cromatográfica de altas concentrações de chiquimato nas raízes de soja convencional expostas ao glifosato e a sua ausência em plantas transgênicas expostas ao herbicida.

OBJETIVOS

Objetivo geral: Capacitar o aluno a utilizar o método cromatográfico para diferenciar soja transgênica resistente ao glifosato de soja convencional.

Objetivos específicos. Após o curso o aluno deverá:

1. Compreender as diferenças genéticas entre as cultivares de soja transgênica e convencional;
2. Entender como ocorre o acúmulo bioquímico de chiquimato em plantas de soja convencional expostas ao glifosato e porque isso não ocorre em variedades de soja transgênicas expostas ao herbicida;
3. Compreender como o acúmulo de chiquimato pode funcionar como um parâmetro para diferenciar cultivares de soja transgênica de cultivares convencionais;
4. Ter conhecimentos básicos sobre cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Para discriminar cultivares de soja transgênica resistente ao glifosato de cultivares convencionais serão utilizados dois procedimentos:
 - a) Utilizando raízes de plântulas com 3 dias de germinação;
 - b) Utilizando raízes de plântulas com 3 dias de germinação e incubadas em solução nutritiva durante 24 hs.
- a) Plântulas com 3 dias de germinação. Sementes de soja glifosato-resistente (BRS-245) e susceptível (BRS-133) serão imersas em 300 mL de uma solução de glifosato durante 4 horas (Marchiosi et al., 2009). Após o período de imersão as sementes serão acondicionadas em duas folhas de papel germitest previamente umedecidas e em seguida postas a germinar no escuro, a 25°C. As raízes das plântulas com 3 dias serão utilizadas para extração do chiquimato.
- b) Plântulas incubadas por 24 horas em solução nutritiva. Sementes de soja transgênica e convencional (das variedades descritas acima) serão distribuídas em duas folhas de papel germitest e levadas a câmara de germinação com temperatura de 25° C onde permanecerão durante 3 dias (Soares et al., 2007). Após a germinação 25 plântulas de tamanho uniforme serão acondicionadas em suportes de acrílico e transferidas para recipientes de vidro contendo 200 mL de uma solução nutritiva de Hoagland meia-força pH 6,0 contendo ou não glifosato. Os recipientes serão mantidos em câmara de crescimento com temperatura controlada (25°C) e fotoperíodo de 12 hs. A solução nutritiva será continuamente aerada com auxílio de um compressor. Após 24 hs de incubação as raízes serão excisadas e imediatamente utilizadas para extração do chiquimato.
2. Extração e quantificação do chiquimato. Raízes (0,5 g) obtidas como descrito acima, serão maceradas em gral contendo 1,5 mL de HCl 0,25 N. O material será submetido a uma centrifugação (1200 x g) durante 10 minutos, a temperatura ambiente, e o sobrenadante utilizado para quantificação do chiquimato (Singh and Shaner, 1998). Após diluição as amostras serão filtradas e injetadas em uma cromatógrafo líquido da Shimadzu® (Tokyo, Japão) equipado com uma bomba LC-10AD, um injetor manual Rheodine®, um detector SPD-10A UV e um módulo de comunicação CBM-101. Será utilizada uma coluna de fase reversa Shimpack® CLC-ODS (M) (150 x 4,6 mm, 5 mm) juntamente com uma pré-coluna (10 x 4,6 mm). A fase móvel será uma solução de ácido fosfórico 3,5 mM com um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ numa corrida isocrática de 10 minutos (Lydon and Duke, 1988). A absorbância será acompanhada em 220 nm, um comprimento de onda previamente

determinado através de um espectro de absorção de um padrão de ácido chiquímico dissolvido na fase móvel. O chiquimato das amostras será identificado comparando o tempo de retenção com o de um padrão 20 μ M de chiquimato. A concentração de chiquimato na amostra será igual à concentração do padrão x área do pico da amostra/área do pico do padrão. Os resultados serão expressos como mg de chiquimato g⁻¹ de matéria fresca, representado pela média de 4 experimentos independentes $\pm$ erro padrão.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R.B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, v.52, p.799-804, 2003.
- BECERRIL, J.M.; DUKE, S.O.; LYDON, J. Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry*, v.28, p.695-699, 1989.
- CUNHA, C.S.M.; TILLMANN, M. A.A.; VILLELA, F.A.; DODE, L.B E BALERINI, F. Comparação de métodos na detecção de sementes de soja geneticamente modificada resistente ao glifosato. *Revista Brasileira de Sementes*, v.27, p.167-175, 2005.
- DUKE, S.O. Glyphosate. p. 1-70. In P.C. Kearney and D.D. Kaufman (ed.) *Herbicides: Chemistry, degradation, and mode of action*. V.3. Marcel Dekker, New York, 1988.
- FISHER, R.S.; BERRY, A.; GAINES, C.G. JENSEN, R.A. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in Eubacteria. *Journal of Bacteriology*, v.168, p.1147-1154, 1986.
- FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. Glyphosate's molecular mode of action. In: *Glyphosate. A unique global herbicide*. American Chemical Society. Monograph 189, p.521-615, 1997.
- GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, H.C. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. ACADCOM Editora, 67p., 2005.
- HARRISON, L.A.; BAILEY, M.R.; NAYLOR, M.; REAM, J.; HAMMOND, D.L. The expressed protein in synthase in glyphosate-tolerant soybeans, 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase from *Agrobacterium* sp. Strain CP4, is rapidly digested and is not toxic to mice upon acute administration. *Journal of Nutrition*, v.128, p.756-761, 1996.
- HERNANDEZ, A.; GARCIA-PLAZZOLA, J.I.; BECERRIL, J.M. Glyphosate effects on phenolic metabolism of nodulated soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.2920-2925, 1999.
- JAWORSKI, E.G. Mode of action of N-phosphonomethyl-glycine inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.20, p.1195-1198, 1972.
- KREMER, R.J.; MEANS, N.E.; KIM, S. Glyphosate affects soybean root exudation and rhizosphere micro-organisms. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v.85, p.1165-1174, 2005.

- KRUSE, N.D.; TRESSI, M.M.; VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores da EPSPs: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Herbicidas*, Brasília, v.2, p.139-146, 2000.
- LYDON, J.; DUKE, S.O. Glyphosate induction of elevated levels of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.36, p.813–818, 1988.
- MARCHIOSI, R.; FERRARESE, M.L.L.; BONINI, E.A.; FERNANDES, N.G.; FERRO, A.P., FERRARESE-FILHO, O. Glyphosate-induced metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L) roots. *Pesticide Biochem. Physiol.*, v.93, p.28–33, 2009.
- PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.D.; RE, B.; La VALLEE, B.J.; TINNIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A.; PESCHKE, W.M.; NIDA, D.L.; TAYLOR, N.B. Development, identification and characterization of a glyphosate tolerant soybean line. *Crop Science*, v.35, p.1451-1461, 1995.
- REDDY, K.N.; ZABLOTOWICZ, R.M. Glyphosate-resistant soybean response to various salts of glyphosate and glyphosate accumulation in soybean nodules. *Weed Science*, v.51, p.496–502, 2003.
- SOARES, A.R.; FERRARESE, M.L.L.; SIQUEIRA, R.C.; BOHM, F.M.L.Z.; FERRARESE, O. L-Dopa increases lignification associated with *Glycine max* root growth-inhibition. *Journal of Chemical Ecology*, v.33, p.265-275, 2007.
- SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technology*, v.12, p.527-530, 1998.
- STEINRUCKEN, H.C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimic acid-2-phosphate synthetase. *Biochemistry and Biophysical Research Commun.*, v.94, p.1207–1212, 1980.
- TORSTENSSON, N.T.L.; HAMISSEPP, A. Detoxification of glyphosate in soil. *Weed Research*, v.17, p.209–212, 1977.

ALELOPATIA: PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Prof. Dr. Carlos M. Bonato
Prof.^a Dra. Emy L. I. Iwamoto

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade sabe-se que algumas espécies vegetais podem prejudicar o crescimento e o desenvolvimento de outras que se encontram nas proximidades. Por muito tempo esse fato foi tido como inexplicável (GOLDFARB, 2009). Em 1996 a Sociedade Internacional de Alelopatia definiu o termo alelopatia como sendo “qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influencie o crescimento e o desenvolvimento da agricultura e sistemas biológicos” (REIGOSA, 2006).

Atualmente sabe-se que as plantas produzem grande variedade de compostos orgânicos que aparentam não ter função direta no crescimento e desenvolvimento, conhecidos como metabólitos secundários. Geralmente estes metabólitos influenciam diretamente os processos de respiração, fotossíntese, transporte de solutos, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Os metabólitos secundários também se diferenciam dos metabólitos primários por apresentarem distribuição restrita dentre os vegetais, podendo restringir-se a uma única espécie, o que não ocorre com os metabólitos primários que podem ser encontrados em todo o reino vegetal. Os estudos sobre os metabólitos secundários foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX, visando à obtenção e identificação de drogas medicinais, venenos, aromatizantes e utilização em indústrias (DUDAI *et al.*, 1999; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Sugere-se que muitos metabólitos secundários possuam funções ecológicas importantes para os vegetais, como proteção contra herbívoros e infecções por microrganismos patogênicos, atuação como atrativos para a polinização e dispersão de sementes, atuação na competição planta-planta e simbiose planta-microrganismo. É comum encontrar monoterpenos e sesquiterpenos voláteis em plantas, mais conhecidos como óleos essenciais, que conferem aroma característico às folhas de diversas espécies, atuando muitas vezes como repelentes de insetos, podendo ser encontrados em tricomas glandulares que se projetam da epiderme advertindo sobre sua toxicidade, repelindo potenciais herbívoros (DUDAI *et al.*, 1999; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Por outro lado, o uso rotineiro de herbicidas sintéticos tem gerado insatisfações de ordem social, principalmente por comprometerem a qualidade dos recursos naturais, gerarem risco para a

fauna silvestre e contaminarem os alimentos que entram na dieta humana. Há necessidade de superar os paradigmas a respeito do controle de plantas daninhas, buscando métodos que sejam eficientes no controle e que respeitem os interesses da sociedade e os recursos naturais. (SOUZA FILHO, 2005).

OBJETIVOS

O curso tem como objetivo estudar os efeitos alelopáticos do óleo de citronela na germinação e crescimento de soja, enfatizando parâmetros bioquímicos como respiração de ápice e de mitocôndrias das raízes.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Material biológico

As sementes de *Glycine max* (L.) Merrill da variedade BRS 283 foram obtidas da Embrapa soja. Será utilizado óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* (Citronela).

2. Local dos experimentos

Os experimentos de germinação serão realizados no laboratório de homeopatia e fisiologia vegetal; já os experimentos de respiração e extração de mitocôndria serão realizados no laboratório de oxidações biológicas da Universidade Estadual de Maringá – PR.

3. Método geral de germinação

As sementes *G. max* (L.) Merrill serão lavadas em água corrente, esterilizadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio contendo 0,25% (v/v) de cloro ativo por 10 minutos e lavadas com água destilada por 6 vezes. Serão dispostas 25 sementes de *G. max* em cada placa gerbox revestida com duas folhas de papel Germitest previamente autoclavadas e umedecidas com 15 mL da solução de citronela ou água.

Os tratamentos serão constituídos de quatro concentrações de óleo essencial de *C. winterianus* (0,03, 0,06, 0,12 e 0,25% (v/v)) diluídos em dimetilsulfoxido (DMSO) (2%, v/v). Os controles serão constituídos de água destilada com DMSO (2%, v/v). As placas serão dispostas de forma aleatória em câmara de germinação tipo *Biological Oxygen Demand* (BOD), com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro a 25°C por 4 dias.

4. Determinação das variáveis de germinação

As variáveis de germinação serão determinadas de 24 em 24h (0 a 72h) após a semeadura. Serão consideradas germinadas para os cálculos das variáveis de germinação as sementes com

radícula igual ou superior a 2 mm. Ao término do experimento (72h), deverá ser avaliado o comprimento radicular e da parte aérea das plântulas utilizando papel milimetrado.

As variáveis determinadas são: porcentagem de germinação (PGER [%]), tempo médio de germinação (TMG [h]), velocidade média de germinação (VMG (h)), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA [cm]), comprimento do sistema radicular (CSR [cm]), comprimento total (CT [cm]), razão do comprimento da parte aérea/sistema radicular (RPA/SR), massa fresca da parte aérea (MFPA [mg]), massa fresca da raiz (MFR [mg]), massa fresca total (MFT [mg]), massa seca da parte aérea (MSPA [mg]), massa seca da raiz (MSR [mg]), massa seca total (MST [mg]), conteúdo de água da parte aérea (CAPA [mg]), conteúdo de água da raiz (CAR[mg] e conteúdo de água total (CAT [mg]) (FERREIRA & BORGHETTI, 2004).

4.1. Porcentagem de germinação (PGER)

$$PGER = (\sum n_i \cdot N^{-1}) \cdot 100$$

Em que $\sum n_i$ é o número total de sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas para germinar (N), expresso em porcentagem;

4.2. Tempo Médio de Germinação (TMG)

$$TMG = \sum n_i \cdot t_i / \sum n_i$$

Em que n_i é o número de sementes germinadas dentro de determinado intervalo de tempo t_{i-1} e t_i , expresso em horas.

4.3. Velocidade Média de Germinação (VMG)

É o inverso de TMG, expresso em horas.

$$VMG = \sum n_i / \sum n_i \cdot t_i$$

4.4. Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

$$IVG = G1 / N1 + G2 / N2 + \dots G_n / N_n$$

Em que G1, G2.... Gn é o número de sementes germinadas e N1, N2...Nn é o número de horas após a semeadura.

4.5. Razão parte aérea sistema radicular (RPA/SR)

$$RPA/SR = CPA/CSR$$

Onde CPA é o comprimento da parte aérea e CSR é o comprimento do sistema radicular.

4.6. Conteúdo de água da parte aérea (CAPA)

$$CAPA = MFPA - MSPA$$

Onde MFPA é massa fresca da parte aérea e MSPA é massa seca da parte aérea, expressas em mg.

4.7. Conteúdo de água da raiz (CAR)

$$CAR = MFR - MSR$$

Onde MFR é massa fresca da raiz e MSR é massa seca da raiz, expressa em miligrama.

4.8. Conteúdo de água total (CAT)

$$CAT = MFT - MST$$

Onde MFT é massa fresca total e MST é massa seca total, expressa em miligrama.

4.9. Massa seca (MS)

A massa seca será obtida após a secagem (massa constante) das partes das plântulas em estufa à 70°C com auxílio de balança analítica.

5. Determinação da atividade respiratória de embriões

Os embriões foram obtidos de sementes submetidas à mesma metodologia utilizada nos experimentos de germinação. Os embriões tiveram sua atividade respiratória determinada 24h após a semeadura, utilizando eletrodo de oxigênio tipo Clark, inserido na câmara de acrílico e conectado a um polarógrafo.

Trinta miligramas de embriões seccionados foram removidos das sementes utilizando tesoura e pinça cirúrgica e inseridos imediatamente na câmara de acrílico contendo 2mL de solução nutritiva (COPELAND & LIMA, 1992), (pH 5,8). A velocidade de consumo de oxigênio foi expressa em nmoles de oxigênio consumidos por minuto relacionada à massa fresca de embriões (g), inserida na câmara de acrílico. A concentração de oxigênio dissolvido no meio de incubação foi de 240 μ M, a 25°C.

Na determinação da respiração mitocondrial via citocromo-oxidase, da respiração via oxidase alternativa e respiração devida a oxidases extramitocondriais utilizou-se o cianeto de potássio (KCN) (250 μ M) como inibidor do complexo IV e como inibidor da oxidase alternativa utilizou-se o ácido salicilhidroxâmico (SHAM).

6. Isolamento de mitocôndria

O isolamento das mitocôndrias será realizado a partir de raízes primárias de *G. max* crescidas por 72h após a semeadura em folha dupla de papel Germitest configurados em rolos, acondicionados em tubos e mantidos no escuro em BOD.

Vinte gramas de raízes das plântulas serão lavadas em água destilada, sua raiz primária seccionada em segmentos de 1 cm e então colocadas em 60 ml de meio de extração contendo manitol 0,4 M, Tris-HCl (pH 7,2) 50mM, EDTA 1,0 mM, $MgCl_2$ 1,0 mM, cisteína 0,1% (p/v) e albumina bovina (BSA) livre de ácidos graxos 0,5% (p/v). O material obtido deve ser homogeneizado por 10s, com auxílio de homogeneizador (modelo van Potter-Elvehjem) e filtrado através de várias camadas de gaze. O pH da solução será ajustado para 7,2 com adição de KOH e então centrifugado a 1000 x g por 10 min. O sobrenadante contendo as mitocôndrias será centrifugado novamente a 15.000 x g por 10 minutos. O sedimento resultante deste processo deve ser suspenso em 2 mL de meio constituído de manitol 0,3 M, EDTA 1,0 mM, HEPES (pH 7,2) 20 mM e albumina bovina (BSA) livre de ácidos graxos 0,2% (p/v). Os procedimentos citados acima foram todos realizados em temperatura de 0-4 °C (KERN *et al.*, 2009).

6.1. Determinação da atividade respiratória de mitocôndrias isolada de *G. max*

O consumo de oxigênio das mitocôndrias isoladas será medido polarograficamente, a 25°C, como foi descrito para a respiração de embriões. O meio de reação contendo manitol 0,4M, KH_2PO_4 5,0mM, $MgCl_2$ 5,0mM, albumina bovina livre (BSA) de ácidos graxos 1,0% (p/v), Tris-HCl (pH 7,2) 10mM, DMSO 2% e óleo essencial de *C. winterianus* (0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03 e 0,06% (v/v)) será adicionado à câmara de acrílico de acordo com o tratamento a ser avaliado. Será adicionado quantidades de mitocôndria de modo a se obter de 1,4 a 1,6 mg de proteína mitocondrial. As avaliações relacionadas ao consumo de oxigênio iniciará pela adição de L-malato 10 mM + NAD^+ 50 mM ou NADH 1,0 mM. A respiração basal é representada pelo consumo de oxigênio dos primeiros 5 minutos aproximadamente. ADP 160 μ M será adicionado iniciando a respiração do estado III. O estado IV da respiração é considerado como o consumo de oxigênio após a exaustão do ADP adicionado. A razão ADP/O e o controle respiratório foram calculados de acordo com Chance & Williams (1955). Para a discriminação da respiração via citocromo-oxidase (COX) e respiração via oxidase alternativa utilizou-se o inibidor KCN 1 mM (KERN *et al.*, 2009).

6.2. Determinação do teor de proteínas

Na determinação do teor de proteínas foram utilizados o reativo A (30 mg de Na_2CO_3 , 4 g de NaOH em 1000 mL de H_2O destilada), o reativo B ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ a 2%), o reativo C (tartarato de sódio a 4%) e o reativo D (reagente de Folin Ciocalteu 1 N).

As suspensões foram diluídas 20 vezes; as soluções foram misturadas no dia do experimento na ordem e volume de 0,2 mL de reativo B, 0,2 mL de reativo C e 20 mL de reativo A. Os tubos de ensaio foram rotulados em triplicata, adicionando-se 0,1 mL da suspensão e 1 mL da mistura dos

reativos. Os controles são constituídos de um branco, com a adição de 0,1 mL de água e um padrão, com a adição de solução de albumina a 20 % (m/v).

Os tubos foram agitados vigorosamente e após 10 minutos em temperatura ambiente adicionou-se 0,1 mL do reativo D. Após 10 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 700 nm contra o branco.

A concentração de proteína foi calculada com base na absorbância encontrada no padrão de albumina 20 % (m/v) de acordo com Lowry *et al.* (1951).

REVISÃO TEÓRICA

Em 1984, Rice definiu o termo alelopatia como sendo os efeitos tanto estimulatórios quanto inibitórios de uma planta sobre a outra planta, incluindo microorganismos. Após o 1º Congresso Mundial de Alelopatia, realizado em 1996 em Cadiz-Espanha, a alelopatia foi definida como: “qualquer processo que envolva metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influencie o crescimento e desenvolvimento dos sistemas biológicos” (ANAYA, 1999). Os aleloquímicos estão presentes em, virtualmente, todos os tecidos vegetais e podem ser liberados ao ambiente por: volatilização através das partes aéreas da planta; lixiviação das partes aéreas pela chuva e orvalho; exsudação pelas raízes; lixiviação proveniente dos restos vegetais ou decomposição da matéria orgânica (biótica e físico-química) (TUKEY, 1969). Por causa disto, o estudo da alelopatia tem recebido considerável atenção nos últimos anos, seja pelos aleloquímicos liberados ao meio, que podem diminuir a produção agrícola (CHOU, 1983; WALLER, 1987), seja pelo potencial que representam como defensivos agrícolas naturais (EINHELLIG, 1985; DUKE e LYNDON, 1988).

Dentre os mais proeminentes compostos com potencial herbicida estão os monoterpenos voláteis, as sesquiterpeno lactonas, as benzoxazinonas e a sorgoleona. Os monoterpenos têm sido os mais extensivamente explorados em programas de manejo de plantas daninhas (VAUGHN e SPENCER, 1993). Estes incluem monoterpenos com grupos funcionais cetonas (carvona, fenchona, pulegona) e álcoois (citronelol, geraniol). Dudai et al. (1999) mostraram, também, que dos óleos testados de trinta e duas espécies de plantas aromáticas, os mais ativos foram os aldeídos de capim limão (*Cymbopogon citratus*).

Contrastando com os inúmeros relatos de interações alelopáticas na comunidade agrícola e a identificação de milhares de compostos químicos que poderiam estar implicados neste fenômeno são poucos os que têm o seu modo de ação ou mecanismo primário de ação conhecidos. Estudos têm indicado que os aleloquímicos com ação fitotóxica afetam direta ou indiretamente um processo fisiológico essencial para a planta incluindo: metabolismo energético (fotossíntese e respiração), balanço hídrico e função estomatal; propriedades dos sistemas de membranas; divisão celular,

atividade de fitohormônios; síntese ou degradação de pigmentos e atividade de enzimas-chave do metabolismo (EINHELLIG, 1995; INDERJIT e DUKE, 2003).

REFERÊNCIAS

ANAYA, A.L. Allelopathy as a tool in the mangement of biotic resources in agro ecosystems. Crit Rev Plant Sci 18; p.697-739, 1999.

CASSEL, E.; VARGAS, R. M. F. Experimentes and modeling of *Cymbopogon winterianus* essential oil extraction by steam distillation. J. Mex. Chem. Soc, v,50(3), p. 126-129, 2006.

CASTRO, H. G.; PERINI, V. B. M.; SANTOS, G. R.; LEAL, T. C. A. B. Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita. Revista Ciência Agronômica, v. 41, n. 2, p. 308-314, abr-jun, 2010.

CHOU, C.H. Allelopathy in agroecosystems in Taiwan. In: Chou,Ch-H e Waller, G. R. (eds) Allelochemicals and Pheromones. Taipei/Taiwan: Academia Sinica Monograph Series Nº 5, p. 27-64, 1983.

COPELAND, L. & LIMA, M. L. The effects of aluminium on enzymes activities in wheat roots. J Plant Physiol 140, 641-652, 1992.

DUDAI, N.; POLJAKOFF-MAYBER, A.; MAYER, A. M.; PUTIEVSKY, E.; LERNER, H. R. Essential oils as allelochemicals and their potential use as bioherbicides. Journal of Chemical Ecology, v. 25, n. 5, p. 1079-1089. 1999.

DUKE, S.O.; LYNDON J. Herbicides from natural compounds. Weed Tech 1: 122-128, 1987.

EINHELLIG, F.A. Allelopathy – a natural protection, allelochemicals. In: Blushan M. (ed.) Handbook of Natural Pesticides: Methods. Volume 1. Theory, Practice, and Detection. Boca Raton/FL: CRC Press, p.161-200, 1985

EINHELLIG, F.A. Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy. In: Inderjit, Dashini KMM e Einhellig FA (eds). Allelopathy: Organisms, Processes, and applications. ACS Symposium Series 583, American Chemical Society, Washington DC, p. 96-116, 1995.

FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artimed, 323p, 2004.

GOLDFARB, M; PIMENTEL, (L.) W; PIMENTEL, N. W. Alelopatia: relações nos agroecossistemas. Tecnol. & Ciên. Agropec., João Pessoa, v.3, n.1, p.23-28, fev. 2009

INDERJIT & DUKE S.O. Ecophysiological aspects of allelopathy. Planta 217: 529-539, 2003.

KERN, K. A.; PERGO, M. E.; KAGAMI, F. L.; ARRAES, L. S.; SERT, M. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. The phytotoxic effect of exogenous etanol on *Euphorbia heterophylla* L. Plant Physiology and Biochemistry, v. 47, p. 1095-1101, 2009.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurements with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193, 265-275. 1951.

REIGOSA, M. J.; PEDROL, N.; GONZÁLEZ, L. Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications. 1 ed. Netherlands. Springer, 2006. 637 p.

SOUZA FILHO, A. P. S.; PEREIRA, A. A. G.; BAYMA, J. C. ALELOQUÍMICO PRODUZIDO PELA GRAMÍNEA FORRAGEIRA *Brachiaria humidicola*. Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 23, n. 1, p. 25-32, 2005.

TUKEY, H.B. Implications of allelopathy in agricultural plant science. Bot Rev 35:1-16, 1969.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal, 4 edição, Porto Alegre, Artimed, 819p, 2009.

VAUGHN, S.F.; SPENCER, G.F. Volatile monoterpenes as potential parent structures for new herbicides. Weed Sci 68: 821-831, 1993.

WALLER, G.R. Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry. ACS, Symposium Series 330, Washington, D. C, p. 606. 1987.

MODELOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS DE OBESIDADE

Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias
Júlio Cezar de Oliveira

INTRODUÇÃO

Obesidade é o resultado de um desequilíbrio energético em longo prazo, onde a ingestão excede o gasto energético diário levando a síntese e estoque excessivo de triacilgliceróis no tecido adiposo. A obesidade e seus problemas correlacionados são considerados atualmente como uma crescente epidemia de saúde pública, particularmente nos Estados Unidos da América (EUA). Correntemente 34% da população dos EUA é clinicamente considerada obesa ($IMC > 30$) e 68% são sobrepesados ($IMC > 25$) mais que o dobro da média em todo o mundo (JANESICK e BLUMBERG, 2011). Recentemente vem sendo observado uma epidemia de obesidade também em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil (MARTINS et al., 2004, SAWAYA et al., 2004). A obesidade é considerada uma fisiopatologia de gênese multifatorial. Recentemente vários estudos vêm mostrando que dentre as várias possíveis causas, a obesidade pode ser provocada por uma programação metabólica no início da vida pré e/ou perinatal, fato que se deve a alterações metabólicas que induzem o indivíduo a um desequilíbrio nas vias centrais (orexigênicas e anorexigênicas) de controle que regulam o balanço energético (VICKERS et al., 2000, BREIER et al., 2001, PLAGEMANN, 2005, KRECHOWEC et al., 2006, ARMITAGE et al., 2008).

A homeostase energética requer do Sistema Nervoso Central (SNC) um ajuste preciso do controle do processo fome/saciedade. Em resposta a alterações nos estoques energéticos periféricos, neurônios hipotalâmicos sensíveis a essas mudanças percebem, integram e as respondem através da ativação e/ou inibição de vias anorexigênicas e/ou orexigênicas (SCHWARTZ et al., 2000). No núcleo arqueado (ARC) hipotalâmico estão localizadas subpopulações de neurônios alvos da ação dos hormônios de adiposidade, insulina e leptina. Esses neurônios co-expressam tanto neuropeptídeos anorexigênicos (neurônios pró-ópiomelanocortina – POMC e transcrito relacionado com cocaína e anfetamina - CART) quanto orexigênicos (peptídeo relacionado com o gene Agouti – AgRP e neuropeptídeo Y - NPY) os quais, respectivamente, promovem o balanço energético negativo e positivo (ELIAS et al., 1999, BARSH e SCHWARTZ, 2002, SEELEY e WOODS, 2003).

Como vem sendo mostrado através de vários trabalhos experimentais, os modelos de obesidade mais comumente utilizados em laboratórios experimentais são, entre outros, os produzidos por indução de lesões nas células do ARC através de aplicações subcutâneas de monossódio L-glutamato (MSG) durante os primeiros dias de vida do animal (OLNEY, 1969,

NASCIMENTO CURI et al., 1991), os modelos por indução através de dietas rica em gorduras (HOWARD, 2002, PRADA et al., 2006) e por uma programação metabólica pós-parto através da superalimentação da prole por reduzir o tamanho normal da ninhada (DAVIDOWA e PLAGEMANN, 2000). Desse modo considerando a linha de pesquisa do nosso laboratório nos propomos aqui, a oferecer um curso que aborde um pouco a temática envolvendo a etiologia da obesidade e os mecanismos de regulação de secreção de insulina e controle glicêmico, os quais são parâmetros metabólicos classicamente alterados em indivíduos obesos.

OBJETIVO

Discutir mecanismos fisiopatológicos, celulares e moleculares do desenvolvimento da obesidade e mostrar a obtenção de alguns modelos animais.

Além disso, também preparar os alunos de graduação que tenham interesse em ingressar na experimentação biológica na área de fisiologia.

METODOLOGIA

O curso utilizará para as práticas experimentais ratos Wistar adultos (90 a 100 dias de vida), obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Biologia Celular e Genética. Os protocolos experimentais serão desenvolvidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá.

1. Obesidade MSG

A indução da obesidade através da aplicação subcutânea do MSG provoca lesão das células do núcleo arqueado por uma overdose precoce MSG que nessa situação age, com efeito, neurotóxico.

1.1. Preparo da solução

Deve-se usar 6g de MSG e completar para 25mL de água destilada. A solução deve ser mantida em temperatura ambiente 25°C.

Aconselha-se fazer a solução de MSG sempre previamente a sua aplicação, pois com o passar do tempo ela pode fungar. Desse modo é importante que se observe o seu estado de conservação antes de fazer a aplicação.

1.2. Aplicação da solução

A aplicação deve ser realizada durante os cinco primeiros dias de vida do animal na dose (4mg/g de massa corpórea de animal). Para isso se usa uma agulha de insulina, a qual deve ser

mantida, sempre, esterilizada com álcool e água destilada durante a aplicação. A injeção deve ser aplicada na região dorsocervical (nuca) do rato, subcutaneamente.

1.3. Dose de Aplicação

1.3.1. Dose MSG (g/mL)

6g (de MSG) ----- 25mL

Xg (de MSG) ----- 1mL

$$Xg = 6/25 \longrightarrow X = 0,24g/mL \quad \text{ou} \quad 240mg/mL$$

1.3.2. Volume de injeção (mL)

A. Como cada rato receberá (4mg/g de massa corpórea, MC) então:

4mg (de MSG) ----- 1g de MC

Xmg (de MSG) ----- Peso do rato (em gramas)

$$Xmg = 4 \times (MC \text{ do Rato})$$

B. Como são (240mg/mL), logo:

1mL (de solução) ----- 240mg (de MSG)

XmL (solução) ----- 4 x (Massa Corpórea do Rato)

$$XmL = 0,0166 \times (\text{Massa Corpórea do Rato})$$

Desse modo cada rato deve receber uma injeção (mL) no volume de 0,0166 multiplicado pelo valor de sua massa corpórea.

2. Obesidade por Redução de Ninhada

A obesidade induzida por redução do tamanho normal da ninhada consiste de uma redução da ninhada para 3 filhotes por mãe lactante para que os mesmos tenham uma oferta de leite e com isso sejam superalimentados.

3. Obesidade por Dieta Rica em Gordura

A obesidade induzida por dieta rica em gordura consiste de uma alimentação da prole, logo após o desmame até os 90 dias de vida, com uma dieta contendo 30% de gordura saturada. A constituição da dieta segue normas da AIN-93 (REEVES et al., 1993).

Componentes	Valores (g/kg)
Amido de milho	124,6
Caseína	200,0
Amido de milho dextrinizado	132,0
Sacarose	100,0
Óleo de soja	39,0
Banha de porco	303,9
Celulose microfina	50,0
Mistura de Sais Minerais	35,0
Mistura de Vitaminas	10,0
L-Cistina	3,0
Bitartarato de colina	2,5
Total (g)	1000,0

4. Procedimentos Cirúrgicos para Estudar o Envolvimento do SNA

4.1. Canulação da veia jugular:

Essa cirurgia implica no implante de uma cânula de silicone na veia jugular externa direita em ratos sob efeito da mistura anestésica quetamina/xilasina (3 + 0,6mg/100g de CM im, respectivamente). Através de uma incisão na região cervical anterior, para isso os tecidos devem ser dissecados até a visualização da veia e em seguida a cânula de silicone inserida dentro da veia com o auxílio de uma agulha adaptada. Após, a cânula deve ser afixada ao músculo peitoral maior através de uma sutura simples com fio de algodão. A cânula deve ser preenchida com solução de heparina a 10% (Liquemine®) diluída em salina (0,9% de NaCl), para evitar a entrada de sangue e a consequente formação de coágulos no seu interior.

Esse procedimento é realizado para que se executar dois testes importante que permitem avaliar a capacidade de secreção de insulina e o controle glicêmico em uma situação pós-prandial. São os teste de tolerância a glicose (ivGTT) e de tolerância a insulina (ITT).

4.2. Isolamento dos nervos superiores: (Parassimpático, Vago e Simpático, Ganglio Cervical Superior):

O objetivo desse procedimento é a realização do registro da atividade eletrofisiológica do ramo superior cervical do nervo vago e do gânglio cervical superior simpático. Para isso, ratos anestesiados intraperitonealmente com tiopental (45mg/kg de massa corpórea) devem ser imediatamente submetidos ao procedimento cirúrgico de incisão na região ventrocervical e dissecação dos tecidos e músculos que recobrem a traquéia. Com o uso de tesouras e pinças oftalmológicas apropriadas e auxílio de cotonetes os tecidos adjacentes à artéria carótida devem ser dissecados até que o ramo superior do nervo vago seja visto paralelamente a artéria carótida. Após a visualização do nervo os procedimentos devem ser realizados com auxílio de uma lupa

estereoscópica. Após o nervo totalmente isolado dos tecidos circundantes deve então ser sobreposto em um par de eletrodos de prata no interior de uma gaiola metálica (Gaiola de Faraday). Conectado a um sistema de amplificação e filtragem de sinais elétricos de alta impedância (Bio-Amplificador, Insight®), com capacidade de captação de frequências de sinais em um espectro de (1 a 80kHz), modificado de (LEON-QUINTO et al., 1998).

A atividade elétrica será contabilizada pela taxa de despolarização e repolarização do nervo, e armazenada em HD através de um Software (Monitor Bio-Amplificador, Insight®, Ribeirão Preto/SP, Brazil) que a registrará graficamente.

4.3. *Vagotomia bilateral subdiafragmática*

Os animais sob efeito da mistura anestésica quetamina/xilasina (3 + 0,6mg/100g de CM im, respectivamente) serão colocado em decúbito dorsal e tricotomizados. Uma incisão ventral cutânea de aproximadamente dois centímetros será realizada inferiormente ao esterno. Será feita uma incisão similar através da parede muscular abdominal. Os intestinos serão retraídos caudalmente e o fígado cranialmente para expor o esôfago. Com o auxílio de uma lupa, os ramos anterior e posterior do nervo vago que se localizam junto à superfície do esôfago serão gentilmente esmiuçados e seccionados com tesouras e pinças de precisão. A incisão muscular será fechada com sutura contínua absorvível e a incisão cutânea com sutura simples não absorvível.

REFERÊNCIAS

ARMITAGE JA, POSTON L, TAYLOR PD (2008) Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. *Front Horm Res* 36:73-84.

BARSH GS, SCHWARTZ MW (2002) Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet* 3:589-600.

BREIER BH, VICKERS MH, IKENASIO BA, CHAN KY, WONG WP (2001) Fetal programming of appetite and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 185:73-79.

DAVIDOWA H, PLAGEMANN A (2000) Different responses of ventromedial hypothalamic neurons to leptin in normal and early postnatally overfed rats. *Neurosci Lett* 293:21-24.

ELIAS CF, ASCHKENASI C, LEE C, KELLY J, AHIMA RS, BJORBAEK C, FLIER JS, SAPER CB, ELMQUIST JK (1999) Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23:775-786.

HOWARD BV (2002) Dietary fat as a risk factor for type 2 diabetes. *Ann Ny Acad Sci* 967:324-328.

JANESICK A, BLUMBERG B (2011) Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res C Embryo Today* 93:34-50.

KRECHOWEC SO, VICKERS M, GERTLER A, BREIER BH (2006) Prenatal influences on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity. *J Endocrinol* 189:355-363.

LEON-QUINTO T, MAGNAN C, PORTHA B (1998) Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology* 139:3382-3389.

MARTINS PA, HOFFMAN DJ, FERNANDES MT, NASCIMENTO CR, ROBERTS SB, SESSO R, SAWAYA AL (2004) Stunted children gain less lean body mass and more fat mass than their non-stunted counterparts: a prospective study. *Br J Nutr* 92:819-825.

NASCIMENTO CURI CM, MARMO MR, EGAMI M, RIBEIRO EB, ANDRADE IS, DOLNIKOFF MS (1991) Effect of monosodium glutamate treatment during neonatal development on lipogenesis rate and lipoprotein lipase activity in adult rats. *Biochem Int* 24:927-935.

OLNEY JW (1969) Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721.

PLAGEMANN A (2005) Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. *Physiol Behav* 86:661-668.

PRADA PO, PAULI JR, ROPELLE ER, ZECCHIN HG, CARVALHEIRA JB, VELLOSO LA, SAAD MJ (2006) Selective modulation of the CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of high fat diet treated rats. *FEBS Lett* 580:4889-4894.

REEVES PG, NIELSEN FH, GEORGE C, FAHEY J (1993) AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition* 123:12.

SAWAYA AL, MARTINS PA, GRILLO LP, FLORENCIO TT (2004) Long-term effects of early malnutrition on body weight regulation. *Nutr Rev* 62:S127-133.

SCHWARTZ MW, WOODS SC, PORTE D, JR., SEELEY RJ, BASKIN DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.

SEELEY RJ, WOODS SC (2003) Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nat Rev Neurosci* 4:901-909.

VICKERS MH, BREIER BH, CUTFIELD WS, HOFMAN PL, GLUCKMAN PD (2000) Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E83-87.

O ENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO (SNA) NO DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias
Luiz Felipe Barella

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a obesidade tem se alastrado por diversas populações e faixas etárias em todo o mundo. O estilo de vida atual com dietas ricas em gorduras e carboidratos, aliado ao sedentarismo, são fatores que contribuem para o desenvolvimento da síndrome metabólica que é marcada pela resistência periférica à insulina, diabetes tipo 2 e obesidade entre outras características (Bell, Spencer *et al.*, 1997; Martinez, 2000; Haslam e James, 2005). Alimentação rica em gordura interrompe o complexo equilíbrio de mediadores metabólicos e endócrinos, como leptina, insulina e glicocorticóides que controlam o gasto de energia e ingestão de alimento (Fehm, Kern *et al.*, 2006; Badman e Flier, 2007; Gerozissis, 2008).

No outro extremo, a subnutrição ainda hoje afeta inúmeros países em todo o mundo, sendo os países subdesenvolvidos os principais alvos das consequências fisiopatológicas dessa injúria (De Moura e Passos, 2005). O Brasil vem passando por uma transição nutricional. Os efeitos da desnutrição, como baixo peso, menores reservas energéticas, dentre outros, vem sendo sobrepostos nos últimos anos pela obesidade (Batista Filho e Rissin, 2003; Siqueira, Appolinario *et al.*, 2004; Hallal, Wells *et al.*, 2005). Quando ocorrida no início da vida, a subnutrição é responsável por programar permanentemente o indivíduo para distúrbios metabólicos na vida adulta (Plagemann, Harder *et al.*, 2000; Coupe, Dutriez-Casteloot *et al.*, 2009).

Um dos maiores problemas do estudo da obesidade é que a regulação do balanço energético é de grande complexidade, envolvendo causas multifatoriais, tais como fatores genéticos, neurais e endócrinos entre outros. O metabolismo é um alvo muito importante para disfunção do controle do peso corporal, incluindo os níveis de insulina na circulação (Plagemann, Heidrich *et al.*, 1992; Hill e Peters, 1998; Rodrigues, De Souza *et al.*, 2007).

Desde a década passada o sistema nervoso central (SNC) vem sendo reconhecido como um fator chave no controle da homeostase energética, mediado principalmente pela região hipotalâmica (Berthoud e Morrison, 2008). O núcleo arqueado (ARC) é uma região de neurônios extremamente importantes para o controle do peso corporal. No ARC convergem a maioria dos sinais nutricionais e hormonais da periferia. Esses sinais são processados e distribuídos para outros centros, em outras regiões do cérebro que irão determinar comportamentos para manter o equilíbrio do consumo e gasto de energia (Williams, Bing *et al.*, 2001). O estado metabólico no SNC é mediado em parte pelos níveis circulantes de insulina e leptina (Abizaid e Horvath, 2008; Obici, 2009). O ARC atua

integrando esses sinais periféricos e essa informação é repassada a vários alvos hipotalâmicos de segunda ordem para que ocorram respostas adequadas para cada situação metabólica (Yoshimatsu, Egawa *et al.*, 1993; Gao e Horvath, 2008). Como o hipotálamo constitui um dos principais centros de ativação do sistema nervoso autônomo (SNA), essas respostas são encaminhadas e os sinais autônômicos são transmitidos por dois principais componentes eferentes: Sistema Nervoso Simpático (SNS) que secreta noradrenalina, agindo através dos receptores adrenérgicos e Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) que secreta acetilcolina que age através de, principalmente, receptores muscarínicos, em vários tecidos da periferia, incluindo o pâncreas (Ashcroft e Ashcroft, 1992; Yamaguchi, 1992; Ahren, 1999). As eferências do SNA para as células beta pancreáticas desempenham funções importantes na regulação da secreção de insulina, de maneira geral a ativação do SNP potencializa a secreção de insulina estimulada pela glicose (Gilon e Henquin, 2001) ao passo que o SNS inibe (Ahren, 2000).

Há décadas surgiram hipóteses de que os modelos de obesidade genéticos e experimentais apresentam um desarranjo na atividade do SNA, sendo o componente parassimpático hiperativo enquanto o simpático tem atividade reduzida, o que explicaria a hiperinsulinemia e resistência periférica e central à ação da insulina (Bray e York, 1979; Bray, 1991; Bray, 1998; Balbo, Grassioli *et al.*, 2007). Nosso laboratório vem mostrando, através da medição direta da atividade elétrica do nervo vago, que ratos alimentados com dieta hiperlipídica (ratos-HFD) apresentam elevada atividade parassimpática em jejum (dados não publicados), assim como em outros modelos de obesidade (Scomparin, Gomes *et al.*, 2009).

O nervo vago, principal nervo parassimpático, possui um importante papel na interação entre os mecanismos centrais e periféricos. No seu trajeto o nervo vago dá origem a vários ramos que inervam a faringe e a laringe, entrando na formação dos plexos viscerais que promovem a inervação autônoma da maioria das vísceras torácicas e abdominais (Guyton e Hall, 2006). Assim quando realizamos a vagotomia bilateral subdiafragmática estamos eliminando a inervação vagal da maioria das vísceras abdominais. Resultados publicados pelo nosso laboratório mostram que a vagotomia, realizada em ratos-HFD aos 60 dias de idade, é capaz de promover diminuição em determinados estoques de tecido adiposo corporal mesmo que não altere o ganho de peso, além disso, promove grande distensão gástrica a qual é consequência da estase estomacal decorrente da vagotomia (Barella, Makiyama *et al.*, 2010). Segundo Balbo *et al.* (2000; 2002) a obesidade de ratos obesos-MSG é parcialmente revertida pela vagotomia bilateral subdiafragmática. Além disso, a resistência à insulina neste modelo é revertida pela vagotomia bilateral subdiafragmática (Balbo, Mathias *et al.*, 2000; Balbo, Bonfleur *et al.*, 2002).

Com esta base, buscamos neste curso discutir a hipótese de que na gênese da obesidade, o desequilíbrio do SNA é peça importante, usando métodos diretos e indiretos de avaliação da atividade simpática e parassimpática.

OBJETIVO

Discutir a hipótese de que no desenvolvimento e manutenção da obesidade, o desequilíbrio do SNA é peça importante. Neste curso vamos demonstrar métodos diretos e indiretos de estudo e avaliação da atividade simpática e parassimpática.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Serão utilizados ratos Wistar, idade entre 70-100 dias, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Biologia Celular e Genética. Os protocolos experimentais serão desenvolvidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, para o qual também será submetido.

2. Vagotomia bilateral subdiafragmática

O animal anestesiado intramuscularmente com xilasina e quetamina (0,6mg+3mg/100g de massa corpórea, respectivamente) será colocado em decúbito dorsal e tricotomizado. Uma incisão ventral cutânea de aproximadamente dois centímetros será realizada inferiormente ao esterno. Uma incisão similar ocorrerá através da parede muscular abdominal. Os intestinos serão retraídos caudalmente e o fígado cranialmente para expor o esôfago. Com o auxílio de uma lupa, os ramos anterior e posterior do nervo vago que se localizam junto à superfície do esôfago serão gentilmente esmiuçados e seccionados com tesouras e pinças de precisão. A incisão muscular será fechada com sutura contínua absorvível e a incisão cutânea com sutura simples não absorvível.

3. Teste de tolerância à glicose intravenosa

(ivGTT – intravenous glucose test tolerance)

Com o intuito de observar o controle glicêmico, os animais serão submetidos ao ivGTT. Para a realização do procedimento, sob anestesia via intramuscular de xilasina e quetamina (0,6mg+3mg/100g de massa corpórea, respectivamente), os ratos passarão por uma cirurgia para a implantação de uma cânula de silicone na veia jugular direita. A cânula será fixada nas costas dos animais para evitar que o animal a rejeite. Para evitar o aparecimento de coágulos, periodicamente a cânula será lavada com solução de salina contendo heparina (50 UI/mL). Depois de um dia da

cirurgia os ratos serão submetidos a 12 horas de jejum. Sem qualquer anestesia, serão retiradas amostras de sangue (200 uL) através da cânula. Primeiramente será retirada uma amostra basal (tempo zero) e logo em seguida os animais receberão, também via cânula, uma carga de glicose correspondente a 2g/Kg de peso corporal do animal. Aos 5, 15, 30 e 45 min serão colhidas amostras de sangue que serão posteriormente dosadas. Para a dosagem dos níveis de glicose plasmática será utilizada a técnica da glicose-oxidase (kit Gold Analisa).

4. Teste de tolerância à insulina intraperitoneal e K_{itt}

(ipITT – intraperitoneal insulin tolerance test)

Esse mesmo grupo de ratos com a cânula já implantada e jejum de 6 horas, será utilizado para o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (1UI/kg BW). As amostras para determinação da concentração de glicose sanguínea serão coletadas em zero (basal), 5, 15, 30, 45 min após a injeção de insulina, como descrito para o ivGTT. Depois disso, a taxa de absorção de glicose pelo tecido ou a taxa constante para o desaparecimento da glicose plasmática (K_{itt}) será calculada pela fórmula $0,693/(t_{1/2})$, como indicado em outros trabalhos. A glicose plasmática $t_{1/2}$ será calculada da análise da inclinação dos mínimos quadrados das concentrações de glicose plasmática durante a fase linear de declínio (Hirata, Alvarez-Rojas *et al.*, 2003).

5. Avaliação do nível de atividade do nervo vago e do nervo cervical simpático

Com o objetivo de registrar a atividade elétrica do nervo vago e do nervo cervical simpático, os ratos, anestesiados intraperitonealmente com Thiopental (45mg/Kg de massa corpórea de rato), sofrerão um corte na região ventrocervical para a realização da dissecação dos tecidos circundantes dos nervos, com o uso de tesouras, pinças e cotonetes. Após o isolamento com auxílio de pinças de alta precisão e de um estereomicroscópio, o animal será levado até o interior de uma gaiola metálica condutora (Gaiola de Faraday), a qual anula qualquer interferência eletromagnética externa. Dentro da gaiola se encontra um par de eletrodos de prata que será colocado sob o nervo (registrando um por vez, durante 10-12min cada), este ficando apenas em contato com o par de eletrodos. O eletrodo está conectado a um amplificador de sinal e filtragem de sinais elétricos para eliminar os sinais de baixas e altas frequências, e com isso captar apenas frequências compreendidas entre 1 - 80kHz (Bioamplificador[®]) (Leon-Quinto, Magnan *et al.*, 1998). O amplificador por sua vez está conectado a um computador equipado com software específico que contabiliza a taxa de despolarização do nervo e registra graficamente. A contagem do número de despolarizações do nervo por cinco segundos (Spikes/5s) será feita por meio de uma escolha padronizada e rigorosamente aleatória de 30% do total de frames contabilizados durante o intervalo de 10-12min de registro da atividade nervosa em que os ratos serão submetidos (Scomparin, Gomes *et al.*, 2009).

REFERÊNCIAS

- ABIZAID, A.; HORVATH, T. L. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regul Pept* [S.I.], v. 149, n. 1-3, p. 3-10, Aug 7 2008.
- AHREN, B. Regulation of insulin secretion by nerves and neuropeptides. *Ann Acad Med Singapore* [S.I.], v. 28, n. 1, p. 99-104, Jan 1999.
- AHRÉN, B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* [S.I.], v. 43, n. 4, p. 393-410, Apr 2000.
- ASHCROFT, F. M.; ASHCROFT, S. J. H. *Insulin : molecular biology to pathology*. Oxford: Oxford University Press, 1992.
- BADMAN, M. K.; FLIER, J. S. The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterology* [S.I.], v. 132, n. 6, p. 2103-15, May 2007.
- BALBO, S. L. *et al.* Parasympathetic activity changes insulin response to glucose and neurotransmitters. *Diabetes Metab* [S.I.], v. 28, n. 6 Pt 2, p. 3S13-7; discussion 3S108-12, Dec 2002.
- BALBO, S.L., GRASSIOLLI, S., RIBEIRO, R.A., BONFLEUR, M.L., GRAVENA, C., BRITO, M. do N., ANDREAZZI, A.E., MATHIAS, P.C., TORREZAN, R. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine* [S.I.], v. 31, n. 2, p. 142-8, Apr 2007.
- BALBO, S.,L., MATHIAS, P.C., BONFLEUR, M.L., ALVES, H.F., SIROTI, F.J., MONTEIRO, O.G., RIBEIRO, F.B., SOUZA, A.C. Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* [S.I.], v. 108, n. 5-6, p. 291-6, Nov-Dec 2000.
- BARELLA, L. F. *et al.* A perda da atividade parassimpática não altera o ganho de peso de ratos programados para obesidade com dieta hiperlipídica. *Endocrinol Diabetes Clin Exp* [S.I.], v. 10, n. 1, p. 7, 2010.
- BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. [Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends]. *Cad Saude Publica* [S.I.], v. 19 Suppl 1, p. S181-91, 2003.
- BELL, R. R. *et al.* Voluntary exercise and monounsaturated canola oil reduce fat gain in mice fed diets high in fat. *J Nutr* [S.I.], v. 127, n. 10, p. 2006-10, Oct 1997.
- BERTHOUD, H. R.; MORRISON, C. The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol* [S.I.], v. 59, p. 55-92, 2008.
- BRAY, G. A. Obesity, a disorder of nutrient partitioning: the MONA LISA hypothesis. *J Nutr* [S.I.], v. 121, n. 8, p. 1146-62, Aug 1991.
- BRAY, G. A.; YORK, D. A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev* [S.I.], v. 59, n. 3, p. 719-809, Jul 1979.
- BRAY, G. A. A. Y., D.A. The MONA LISA hypothesis in the time of leptin. *Recent Prog Horm Res* [S.I.], v. 53, p. 95-117, 1998.

COUPE, B. *et al.* Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J Neuroendocrinol* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 40-8, Jan 2009.

DE MOURA, E. G.; PASSOS, M. C. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep* [S.I.], v. 25, n. 3-4, p. 251-69, Jun-Aug 2005.

FEHM, H. L. *et al.* The selfish brain: competition for energy resources. *Prog Brain Res* [S.I.], v. 153, p. 129-40, 2006.

GAO, Q.; HORVATH, T. L. Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Lett* [S.I.], v. 582, n. 1, p. 132-41, Jan 9 2008.

GEROZISSIS, K. Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *Eur J Pharmacol* [S.I.], v. 585, n. 1, p. 38-49, May 6 2008.

GILON, P.; HENQUIN, J. C. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* [S.I.], v. 22, n. 5, p. 565-604, Oct 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Textbook of medical physiology*. 11th ed. ed. Edinburgh: Elsevier Saunders ; Oxford : Elsevier Science [distributor], 2006.

HALLAL, P. C. *et al.* A shift in the epidemiology of low body mass index in Brazilian adults. *Eur J Clin Nutr* [S.I.], v. 59, n. 9, p. 1002-6, Sep 2005.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. Obesity. *Lancet* [S.I.], v. 366, n. 9492, p. 1197-209, Oct 1 2005.

HILL, J. O.; PETERS, J. C. Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* [S.I.], v. 280, n. 5368, p. 1371-4, May 29 1998.

HIRATA, A. E. *et al.* Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sci* [S.I.], v. 73, n. 11, p. 1369-81, Aug 1 2003.

LEON-QUINTO, T. *et al.* Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology* [S.I.], v. 139, n. 8, p. 3382-9, Aug 1998.

MARTINEZ, J. A. Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc Nutr Soc* [S.I.], v. 59, n. 3, p. 337-45, Aug 2000.

OBICI, S. Minireview: Molecular targets for obesity therapy in the brain. *Endocrinology* [S.I.], v. 150, n. 6, p. 2512-7, Jun 2009.

PLAGEMANN, A. *et al.* Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr* [S.I.], v. 130, n. 10, p. 2582-9, Oct 2000.

PLAGEMANN, A., HEIDRICH, I., GÖTZ, F., ROHDE, W., DÖRNER, G. Lifelong enhanced diabetes susceptibility and obesity after temporary intrahypothalamic hyperinsulinism during brain organization. *Exp Clin Endocrinol* [S.I.], v. 99, n. 2, p. 91-5, 1992.

RODRIGUES, A. L. *et al.* Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol* [S.I.], v. 195, n. 3, p. 485-94, Dec 2007.

SCOMPARIN, D. X. *et al.* Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. *Endocrine* [S.I.], Oct 24 2009.

SIQUEIRA, K. S. *et al.* Overweight, obesity, and binge eating in a non-clinical sample of five Brazilian cities. *Obes Res* [S.I.], v. 12, n. 12, p. 1921-4, Dec 2004.

WILLIAMS, G. *et al.* The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* [S.I.], v. 74, n. 4-5, p. 683-701, Nov-Dec 2001.

YAMAGUCHI, N. Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. *Can J Physiol Pharmacol* [S.I.], v. 70, n. 2, p. 167-206, Feb 1992.

YOSHIMATSU, H. *et al.* Sympathetic nerve activity after discrete hypothalamic injections of L-glutamate. *Brain Res* [S.I.], v. 601, n. 1-2, p. 121-8, Jan 22 1993.

ENSAIO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS EM *Trypanosoma cruzi*

Prof. Dr Celso Vataru Nakamura
Angelo de Oliveira Caleare
Jean Henrique da Silva Rodrigues
Solange Cardoso Martins
Talitha Fernandes Stephanello

INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um protozoário da ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*, caracterizado pela presença de um flagelo e uma mitocôndria, descoberto em 1909 por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas. (NEVES, 2005; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010). A distribuição dos vetores e reservatórios silvestres do *T. cruzi* nas Américas se estende desde os Estados Unidos à Argentina e Chile (COURA & VIÑAS, 2010).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam a existência de 16-18 milhões de infectados pelo *T. cruzi*, contudo, Pinto Dias (2007) estima que em cerca de 18 países endêmicos existam de 12-14 milhões de indivíduos infectados com uma incidência anual de 200.000 casos e milhares de mortes, e aproximadamente 100 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco. No Brasil, predominam os casos crônicos da doença de Chagas decorrentes de infecções adquiridas no passado, com aproximadamente três milhões de indivíduos infectados.

Os insetos vetores são percevejos da ordem Hemiptera pertencentes à família *Reduviidae*, sendo que machos e fêmeas só se desenvolvem e procriam realizando a hematofagia desde a primeira fase da vida até adulto. Cinco espécies têm especial importância na transmissão da doença ao homem. Por ordem de importância: *Triatoma infestans*, *T. braziliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (NEVES, 2005).

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve a passagem obrigatória por hospedeiros vertebrados (homem e mamíferos) e invertebrados (triatomíneos), em uma série de diferentes formas de desenvolvimento. As tripomastigotas sanguíneas ingeridas pelo inseto vetor se diferenciam em epimastigotas proliferativas, que por sua vez se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas no intestino posterior do inseto. As formas metacíclicas invadem as células do hospedeiro vertebrado e se transformam em formas amastigotas, que sofrem novo processo de diferenciação em tripomastigotas, responsáveis pela disseminação da infecção (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2008).

As formas habituais de transmissão da doença de Chagas humana reconhecidas são aquelas ligadas diretamente ao vetor, à transfusão de sangue, à via congênita (CARLIER, 2007), e mais recentemente, as que ocorrem via oral, pela ingestão de alimentos contaminados (PINTO DIAS, 2006). Mecanismos menos comuns envolvem acidentes de laboratório, manejo de animais

infectados (HERWALDT, 2001), transplante de órgãos (CAMPOS *et al.*, 2008) e pelo leite materno (PINTO DIAS, 2006). Clinicamente a infecção é caracterizada por uma fase aguda, seguida da fase crônica, na qual a maioria dos pacientes se mantém assintomáticos, (DANTAS *et al.*, 2006). Os sinais e sintomas, na fase aguda, se manifestam em casos mais extremos, normalmente na maioria dos pacientes esta fase passa despercebida por não ter sido reconhecida ou devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas (PRATA, 2001). Cerca de 60-70% dos pacientes nunca desenvolvem a doença clinicamente aparente, esses pacientes apresentam a forma indeterminada da doença, em que o paciente se apresenta assintomático. (PRATA, 2001; RASSI JÚNIOR *et al.*, 2010). Os restantes 30-40% dos pacientes poderá posteriormente evoluir para uma doença grave e morte prematura. As manifestações clínicas típicas desta fase estão relacionadas com o envolvimento do coração, esôfago, cólon, ou uma combinação e estão agrupadas em três formas principais: cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. Normalmente 10-30 anos após a infecção inicial surgirão os sintomas clínicos da fase crônica (DANTAS *et al.*, 2006; RASSI JÚNIOR *et al.*, 2010).

A quimioterapia específica com os medicamentos disponíveis, os nitroderivados nifurtimox (Lampit®) ou, preferencialmente, o benzonidazol (Rochagan® ou Radanil®) têm sido indicado para o tratamento da fase aguda (PRATA, 2001, SILVA JÚNIOR *et al.*, 2008), com uma taxa de cura de 50-70% (CANÇADO, 1985), em indivíduos cronicamente infectados a taxa de cura é baixa (8-20%) (CANÇADO, 1985, GALVÃO *et al.*, 1993, COURA & CASTRO, 2002). Esses compostos podem causar toxicidade sistêmica (TONIN *et al.*, 2010) com sérios efeitos colaterais, sendo os mais importantes hipersensibilidade (rash, febre, edema generalizado, linfadenopatia, dores musculares e nas articulações), depressão da medula óssea (neutropenia, púrpura trombocitopênica), polineuropatia periférica. A dose diária para benzonidazol é 5-7 mg/kg de peso corpóreo e 8-10 mg/kg de peso corpóreo para o nifurtimox durante 30 ou 60 dias (PRATA, 2001).

OBJETIVOS

Geral

Proporcionar aos alunos conhecimentos sobre técnicas básicas utilizadas para investigar atividade biológica de substâncias naturais e sintéticas frente ao protozoário *T. cruzi*.

Específicos

- Verificar uma possível atividade tripanocida do composto sobre a forma epimastigota de *T. cruzi*;
- Verificar a citotoxicidade do composto sobre a linhagem de células animal LLCMK₂;
- Verificar a influência do composto sobre a formação de autofagossomos na forma epimastigota de *T. cruzi*;
- Verificar se o composto causa alterações na morfologia do protozoário através de microscopia eletrônica de varredura.

MATERIAL E MÉTODOS

Meio liver infusion tryptose (lit)

O meio LIT foi desenvolvido por Yeager e utilizado por Camargo (1964) para estudos de crescimento e diferenciação em *T. cruzi*. Desde então tornou-se o meio mais utilizado para o cultivo da forma epimastigota. Possui em sua formulação infusão de fígado, triptose, hemina, glicose e vários sais, sendo suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Ensaio antiproliferativo

O ensaio antiproliferativo é uma das etapas experimentais iniciais na busca de substâncias com atividade tripanocida. Como objetivo geral do experimento busca-se determinar o valor de IC₅₀ para dada substância, ou seja, a concentração de droga na qual ocorra a inibição de 50% dos protozoários após 96 h de tratamento, quando comparado a um grupo controle.

Pesagem e diluição das drogas

- Pesar a droga utilizando tubos Eppendorf® estéreis (**1 mg** para **compostos isolados** e 10 mg para extratos e frações);
- Adicionar 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) ao eppendorf, agitar até completa dissolução da droga e completar com 900 µL de meio LIT (solução estoque: 1 mg/mL);
- Identificar 4 outros tubos eppendorf estéreis (Concentrações: **500, 100, 50 e 10 µg/mL**) para realizar a diluição da droga;
- Adicionar aos tubos identificados, respectivamente, 500, 800, 500 e 800 µL de LIT;
- Homogeneizar e transferir 500 µL da solução estoque para o tubo 1 (C: 500 µg/mL);
- Homogeneizar o tubo 1 e transferir 200 µL deste para o tubo 2 (C: 100 µg/mL);
- Homogeneizar o tubo 2 e transferir 500 µL deste para o tubo 3 (C: 50 µg/mL);
- Homogeneizar o tubo 3 e transferir 200 µL deste para o tubo 4 (C: 10 µg/mL).

Padronização do inóculo

- Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y serão previamente cultivados em meio LIT suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) por 4 dias à 28 °C;
- Homogeneizar o tubo de cultura, retirar 20 µL e adicionar o volume a um eppendorf contendo 980 µL de formalina 3%;
- Contar as formas epimastigotas presentes no quadrante central (região A) da Câmara de Neubauer (Fig. 1), obter a média dos dois campos de contagem, multiplicar pela diluição (50) e pelo fator de correção da câmara(10⁴), obtendo-se um número **X** de protozoários;

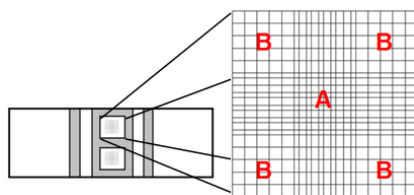


Figura 1. Hematímetro ou Câmara de Neubauer.

- O inóculo para a realização do ensaio antiproliferativo deve ser de 10^6 parasitas/mL, sabendo que em 1 mL existe um número **X** de parasitos realiza-se uma regra de 3 para descobrir qual volume **V** é necessário utilizar para obter 10^6 parasitos/mL;
- Como o experimento em geral é montado simultaneamente para duas drogas em uma placa de 24 poços, é preciso padronizar o volume real (VR) de inóculo a ser coletado para 25 mL (volume **V** x 25= VR).

Preparo do pool

- O pool deve ser preparado em um tubo falcon, sendo composto por 10% de SFB (2,5 mL), 10% da droga (2,5 mL distribuído diretamente nos poços), o volume de inóculo calculado e meio LIT em q.s.p. para 25 mL, além de 31,25 µL de gentamicina.

Montagem e Leitura do experimento

- Transferir 100 µL de cada eppendorf contendo as drogas para dois poços (ensaio em duplicata) da placa, para os poços controle transferir 100 µL de LIT;
- Adicionar 900 µL do pool a cada poço, obtendo-se uma concentração final 10 vezes menor que a realizada no eppendorf;
- Homogeneizar a placa e incubar a 28 °C por 96 h;
- Após o tempo de ensaio realizar a contagem de parasitos em câmara de Neubauer.

Ensaio de citotoxicidade

O Ensaio de citotoxicidade é uma metodologia de ampla utilização que permite verificar o quão tóxica é uma substância para determinada célula. Em nosso caso usaremos células da linhagem LLCMK₂ (Célula epitelial de rim de *Macaca mulata*) como modelo.

Obtenção da monocamada de células

- Garrafas de cultura média contendo um tapete de células já fechado devem ser usadas como fonte de inóculo;
- Retirar o meio de cultura (DMEM) das garrafas e lavar o tapete de células com PBS;
- Adicionar tripsina às garrafas e permitir que a enzima aja por aproximadamente 30 s;

- Observar as células ao microscópio invertido e caso estejam arredondadas bater no fundo da garrafa para completo descolamento do tapete de células;
- Adicionar meio de cultura até formar uma suspensão de 10 mL, reservar em gelo;
- Transferir 100 µL desta suspensão para um eppendorf contendo 900 µL de meio;
- Homogeneizar o conteúdo do eppendorf e proceder a contagem em Câmara de Neubauer (Fig 1), contando apenas as células presentes nos quatro quadrantes laterais (regiões B) de cada campo, dividindo o número total contado por quatro obtendo uma média;
- Multiplicar a média pelo fator de correção da câmara (10^4) e pela diluição (10);
- Proceder os cálculos tal como no ensaio antiproliferativo, sabendo que para o experimento de citotoxicidade é ideal um inóculo de $2,5 \times 10^5$ células;
- Preparar o pool contendo o volume de inóculo calculado, 10% de SFB, Meio de cultura em q.s.p. 10 mL e 12,5 µL de gentamicina;
- Distribuir 100 µL da suspensão homogeneizada em cada poço, deixando três poços vazios para usá-los como branco;
- Incubar em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h.

Tratamento das células

- Pesar e diluir as drogas em DMSO tal como no ensaio antiproliferativo; (para citotoxicidade a quantidade de DMSO é 50 µL)
- Preparar as diluições em eppendorf, utilizando meio de cultura com gentamicina, visando obter concentrações finais de 500, 100, 50, 10 e 1 µg/mL;
- Após a formação da monocamada de células retirar o meio de cultura dos poços e transferir 100 µL de cada eppendorf para os respectivos poços (ensaio em triplicata);
- Manter pelo menos 3 poços da placa sem a adição da droga (controle);
- Incubar em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por 72 h.

Leitura do experimento

- Após o tempo de incubação retirar o meio de cultura, lavar cada poço com 100 µL de PBS, retirar o PBS e adicionar 50 µL de ácido tricloroacético 10%;
- Manter em geladeira por uma hora ao abrigo da luz;
- Desprezar o ácido tricloroacético e lavar em água corrente por 5 vezes, sendo a última em água destilada, após isto deixar a placa secar a temperatura ambiente;
- Adicionar 50 µL/poço de sulforodamina B (0,4% p/v em 1% de solução aquosa de ácido acético);
- Manter a placa por 30 min em geladeira ao abrigo da luz;

- Lavar a placa por 3 vezes com ácido acético 1% para completa remoção do corante;
- Adicionar 150 µL/poço de tampão Tris-base 10 mM;
- Agitar cuidadosamente a placa e realizar a leitura em Leitor de ELISA a 530 nm.

Deteção de autofagossomos por marcação com monodansilcadaverina

A monodansilcadaverina (MDS) é um marcador fluorescente específico para autofagossomos. Sua marcação parece estar relacionada com seu acúmulo em compartimentos ácidos por aprisionamento de íons e interações com lipídios da membrana dos autofagossomos. Esta técnica é útil para avaliação do processo autofágico celular (NIEMANN et al., 2001).

- Preparar suspensão de *T. cruzi* com 10⁶ células (ver antiproliferativo);
- Tratamento das células com concentrações de IC₅₀ e IC₉₀ por 96 h;
- Passar para eppendorf e centrifugar por 3 min a 10.000 RPM;
- Lavar as células 3 vezes com 1 mL de PBS gelado (ressuspender o *pellet* e centrifugar);
- Ressuspender o *pellet* com 0,05 mM de MDS: 990 µL de PBS + 10 µL de MDS 5 mM (MANUSEAR COM A LUZ APAGADA E COBRIR COM PAPEL ALUMÍNIO);
- Incubar por 10 min a 28 °C;
- Lavar 2 vezes com 1 mL de PBS gelado (ressuspender o *pellet* e centrifugar);
- Homogeneizar o conteúdo do eppendorf, colocar 5 µL em lâmina e cobrir com lamínula tratada com poli-L-lisina;
- Observar a presença de autofagossomos no interior das células em microscópio de fluorescência em 525 nm.

Microscopia eletrônica de varredura

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) fornece imagens tridimensionais do material avaliado, cuja a qual é formada pela interação inicial de um feixe de elétrons com a amostra em condições de alto vácuo. Nesta interação elétrons secundários provenientes da amostra são arrancados e coletados por uma sonda para formar uma imagem da topografia do material (SOUZA, 1998). Dentre as suas várias aplicações, a microscopia eletrônica de varredura permite avaliar a morfologia celular de micro-organismos expostos a compostos biologicamente ativos.

- Lavar as células em PBS à temperatura ambiente 3 vezes;
- Preparar uma solução de glutaraldeído à 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M;
- Adicionar ao pellet 1 mL da solução de glutaraldeído (fixação propriamente dita);
- Deixar em temperatura ambiente no mínimo 1 h ou na geladeira por até 48 h;

- Lavar as células fixadas com tampão cacodilato de sódio à 0,1 M 3 vezes;
- Lavar o suporte (chip ou lamínula) com acetona e depois com água;
- Aderir as células previamente fixadas neste suporte com poli-L-lisina;
- Lavar 3 vezes com o tampão cacodilato de sódio à 0,1 M;
- Desidratar em etanol 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100% (10-15 min cada um, exceto em 100%, que deve-se deixar no álcool por 2 ou 3 vezes este tempo);
- Realizar ponto crítico;
- Metalizar com ouro;
- Observar no Microscópio Eletrônico de Varredura Shimadzu SS-550.

REFERÊNCIAS

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paul.*, 6: 93-100, 1964.

CAMPOS, V., STRABELLI, T.M., AMATO NETO, V., SILVA, C.P., BACAL, F., BOCCHI, E.A., STOLF, N.A. – Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. *Journal of Heart Lung Transplant.*, **27**: 597-602, 2008.

CANÇADO, J.R. - Tratamento específico. In *Cardiopatia Chagásica*, (Cançado, J. R. & Chuster, M., Eds). Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte; 327-55, 1985. In ARAÚJO, M.S.S., MARTINS-FILHO, O.A., PEREIRA, M.E.S. , BRENER, Z. – A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45: 819-824, 2000.

CARLIER, Y. – Congenital Chagas disease: from the laboratory to public health. *Bull. Acad. R. Med. Belg.*, 162: 409-416, 2007.

COURA, J.R. ,VIÑAS, P.A. – Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 465: S6-S7, 2010.

COURA, J.R., CASTRO, S.L. – A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97 (1): 3-24, 2002.

DANTAS, A.P., SALOMÃO, K., BARBOSA, H.S., CASTRO, S.L. – The effect of *Bulgarian propolis* against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101: 207-211, 2006.

GALVÃO, L.M., NUNES, R.M., CANÇADO, J.R., BRENER, Z., KRETTLI, A.U. - Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* , 87: 220–3, 1993. In ARAÚJO, M.S.S., MARTINS-FILHO, O.A., PEREIRA, M.E.S., BRENER, Z. – A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45: 819-824, 2000.

HERWALDT, B.L. – Laboratory-acquired infections from accidental exposures. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4): 659-668, 2001. Ministério da Saúde, 2010a, acessado em 18/12/2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_brasil_2005_a_2010.pdf.

NEVES, D.P. – *Parasitologia Humana*. Livraria Atheneu. 11ª Ed., 2005.

NIELMANN, A.; TAKATSUKI, A.; ELSÄSSER, H. P. The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *J. Histochem. Cytochem.*, 48 (2): 251-258, 2001.

PINTO DIAS, J.C. – Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Caderno de Saúde Pública*, 23 Sup. 1: S13-S22, 2007.

PINTO DIAS, J.C. – The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). *Ann. Intern. Med.* 144: 772-774, 2006.

PRATA, A. – Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 1: 91-100, 2001.

RASSI JÚNIOR, A., RASSI, A., MARIN-NETO, J.A. – Chagas disease. *Lancet*, 375: 1388-402, 2010.

SILVA JÚNIOR, E.N., DE SOUZA, M.C.B.V., FERNANDES, M.C., MENNA-BARRETO, R.F.S., PINTO, M.C.F.R., LOPES, F.A., DE SIMONE, C.A., ANDRADE, C.K.Z., PINTO, A.V., FERREIRA, V.F., DE CASTRO, S.L. – Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of derivatives from nor-lapachones and lapachones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 5030-5038, 2008.

SILVA JÚNIOR, E.N., GUIMARÃES, T.T., MENNA-BARRETO, R.F.S., PINTO, M.C.F.R., SIMONE, C.A., PESSOA, C., CAVALCANTI, B.C., SABINO, J.R., ANDRADE, C.K.Z., GOULART, M.O.F., DE CASTRO, S.L., PINTO, A.V. - The evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: synthesis of imidazolic anthraquinones, nor-beta-lapachone derivatives and beta-lapachone-based 1,2,3-triazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18: 3224-3230, 2010.

SOUZA, W. *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas*. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998.

TONIN, L.T.D., PANICE, M.R., NAKAMURA, C.V., ROCHA, K.J.P., DOS SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DA COSTA, W.F., SARRAGIOTTO, M.H. – Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted- β -carbonile)-3-carboxamides. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64: 386-389, 2010.

TÉCNICAS PARA ESTUDO DE ESTRESSE OXIDATIVO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS PROVOCADAS POR ETANOL E OUTRAS DROGAS.

Prof^a. Dra. Emy L. I. Iwamoto
Prof^a. Dra. Jorgete Constantin
Anacharis Babeto de Sá Nakanishi
Cristiane Vizioli de Castro Ghizoni
Eduardo Hideo Gilglioni
Fabiana Rodrigues Silva Gasparin
Gilson Soares do Nascimento
Lilian Brites Campos
Monique Cristine de Oliveira

INTRODUÇÃO

O fígado, por excelência, é o órgão central do metabolismo, o que o torna alvo de estudos básicos (metabolismo primário em geral) e aplicados (doenças metabólicas, por exemplo). Para tal, técnicas utilizando o órgão inteiro(I) ou em frações celulares (II) são de grande valor científico.

(I) O estudo do metabolismo no fígado em perfusão

A perfusão do fígado é uma técnica na qual os vasos aferentes (de entrada; veia porta) e o vaso eferente (de saída; veia hepática) do órgão são canulados, de tal maneira que o experimentador pode controlar a qualidade do líquido arterial e colher, para posterior análise, o líquido venoso. Podem ser utilizadas bombas para impulsionar o líquido de perfusão através do órgão ou a força da gravidade. A microcirculação e as relações intercelulares são, em geral, pouco alteradas.

No fígado em perfusão podem ser medidas várias vias metabólicas, como por exemplo, a neoglicogênese, a glicólise, a glicogenólise, o consumo de oxigênio, a cetogênese, a captação de ácidos graxos, a frutólise, o metabolismo do glicerol, a biotransformação de drogas e assim por diante.

A técnica admite algumas variantes, dependendo dos objetivos a serem atingidos. O esquema da Figura 1.12 ilustra as principais partes do sistema de perfusão monovascular utilizado no Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá. Ele é formado por duas bombas peristálticas (7 e 3 na Figura 1.12), um oxigenador de membrana (2) e pela câmara do fígado (1). A este sistema estão ainda acoplados um microeletrodo de platina (13) com polarógrafo (6), um registrador potenciométrico (4), um banho-maria com bomba de circulação externa do líquido (10), um cilindro contendo a mistura carbogênica (O₂:CO₂/95:5) (8) e uma bomba de infusão (5).

O oxigenador de membrana é formado por um cilindro de alumínio ao redor do qual estão enrolados tubos de borracha silicone de parede fina (0,25 mm) e com comprimento total de 15 metros. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostatzada pelo banho-maria com bomba de circulação externa. O cilindro de alumínio está separado do meio ambiente por uma cobertura cilíndrica de plástico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera de O₂ e CO₂, nas proporções de 95:5.

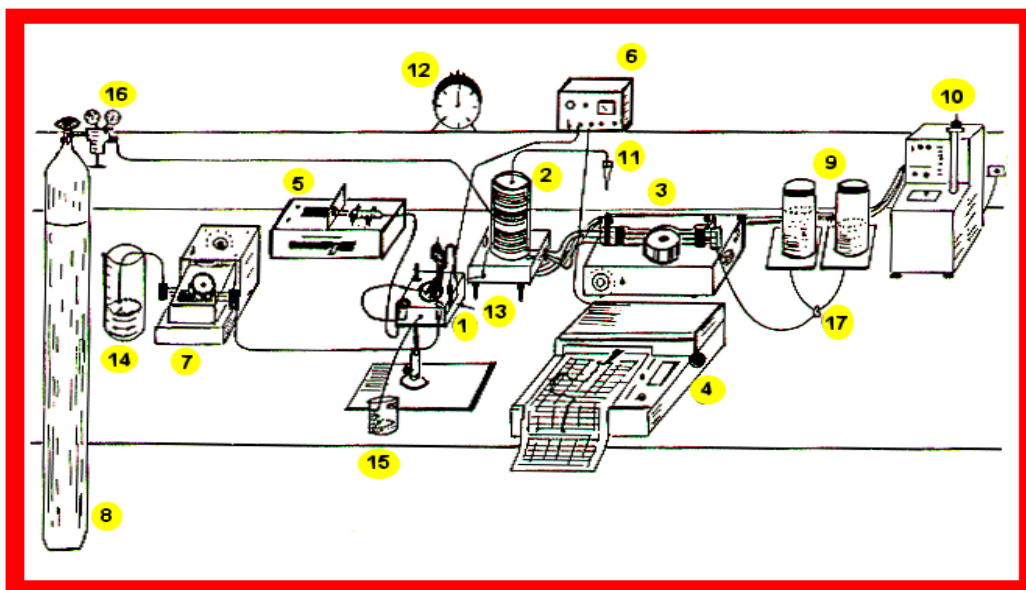


Figura 1.12. Representação semi-esquemática da aparelhagem de perfusão do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade de Maringá. Os componentes estão numerados: (1) câmara do fígado mostrando a posição do fígado isolado e em perfusão; (2) oxigenador de membrana com aquecimento e troca simultânea de gases; (3) bomba peristáltica para o líquido arterial; (4) registrador potenciométrico; (5) bomba de infusão conectada à câmara do fígado; (6) polarógrafo conectado ao registrador; (7) bomba peristáltica para o perfusado venoso; (8) cilindro contendo a mistura carbogênica; (9) reservatórios do líquido de perfusão; (10) banho termostatzado com bomba de circulação externa, conectado ao oxigenador; (11) testemunho do fluxo de gás para o oxigenador; (12) cronômetro; (13) eletrodo de platina e prata (eletrodo de oxigênio), conectado ao polarógrafo; (14) reservatório para o perfusado venoso; (15) colheita do para-fluxo (vazamento) e fluxo biliar; (16) válvula para regular o fluxo de gás; (17) torneira para a troca de líquido de perfusão.

A câmara do fígado é de acrílico transparente, contém um capta-bolhas (dispositivo que impede a entrada de bolhas de ar no fígado), uma câmara para a colheita de amostras e um dispositivo de inserção e fixação do eletrodo de platina. O líquido de perfusão é impulsionado pela primeira bomba peristáltica em direção ao oxigenador. Neste local ocorrem simultaneamente a oxigenação e o aquecimento para 37°C. A dissolução do CO₂ também diminui o pH de 7,6 para 7,4. O líquido segue para a câmara do fígado, entra no órgão pela veia porta e deixa-o pela veia hepática, sendo

colhido pela cânula inserida na veia cava. Após passagem pelo eletrodo de platina e após a colheita de amostras, o líquido remanescente é sugado pela segunda bomba peristáltica para ser descartado. Substratos e drogas podem ser infundidos no líquido entrante através da bomba de infusão ou diretamente dissolvidos no líquido de perfusão, sendo que a troca dos reservatórios pode ser feita através de uma torneira.

No procedimento cirúrgico da perfusão monovascular canula-se a veia porta (via de influxo do líquido de perfusão) e a veia cava (via de efluxo do líquido de perfusão vindo da veia hepática). Para remoção cirúrgica do fígado o rato é previamente anestesiado com tiopental sódico (50 mg kg⁻¹). O animal deve ser deitado em decúbito dorsal numa plataforma ao lado da câmara do fígado. O abdômen é aberto longitudinalmente e o tecido conjuntivo que cerca o fígado é seccionado, mas com cuidado para evitar hemorragias. O estômago deve ser separado do esôfago da seguinte forma: fixam-se duas ligaduras (fio cirúrgico ou de crochê) ao redor do esôfago, uma distal outra proximal em relação ao estômago e corta-se o esôfago entre as duas ligaduras. A seguir desloca-se o estômago e os intestinos para o lado esquerdo do rato (direito do operador). Este procedimento expõe a veia porta e uma porção da veia cava inferior nas proximidades do rim direito. A veia esplênica, que pode ser facilmente identificada como uma ramificação da veia porta deve ser ocluída com uma ligadura. A seguir colocam-se duas ligaduras frouxas ao redor da veia porta e uma ligadura frouxa ao redor da veia cava, acima do rim direito. Neste momento convém verificar o fluxo de líquido de perfusão, oxigenado e aquecido, que deverá estar em torno 10 ml/minuto. A cânula de inserção na veia porta deve ficar preparada e ao alcance do operador. A sua extremidade deve ser pontuda, sem ser cortante (plástico é melhor do que metal). Segurando a veia porta com uma pinça fina o operador deverá efetuar uma pequena incisão na veia porta. O tamanho desta incisão deve levar em conta a espessura da cânula que se pretende inserir e deve situar-se a mais ou menos 1 cm do início da veia esplênica. A seguir, segurando ainda a veia porta com a pinça, deve-se introduzir a ponta da cânula na veia porta. Se o rato estiver próximo à câmara do fígado a torção da cânula impedirá que ela escape, mesmo antes de ser amarrada. Assim o operador poderá posicionar a cânula adequadamente antes de fechar as ligaduras. No posicionamento da cânula deve-se evitar que a ponta ultrapasse em mais de três milímetros a bifurcação que dá origem à veia esplênica.

A canulação da veia porta, sob fluxo, deverá levar ao completo dessangramento do fígado, o qual assume uma cor marrom-avermelhada característica. Se isto não ocorrer é porque o procedimento não foi correto. Por exemplo, a cânula pode ter sido colocada numa posição tal que apenas um ou dois lobos são irrigados. Se o dessangramento for total deve-se fechar a ligadura da veia cava inferior e seccioná-la distalmente. Isto dará vazão ao líquido que está sendo bombeado para a circulação do animal, evitando o inchamento do fígado e outros órgãos.

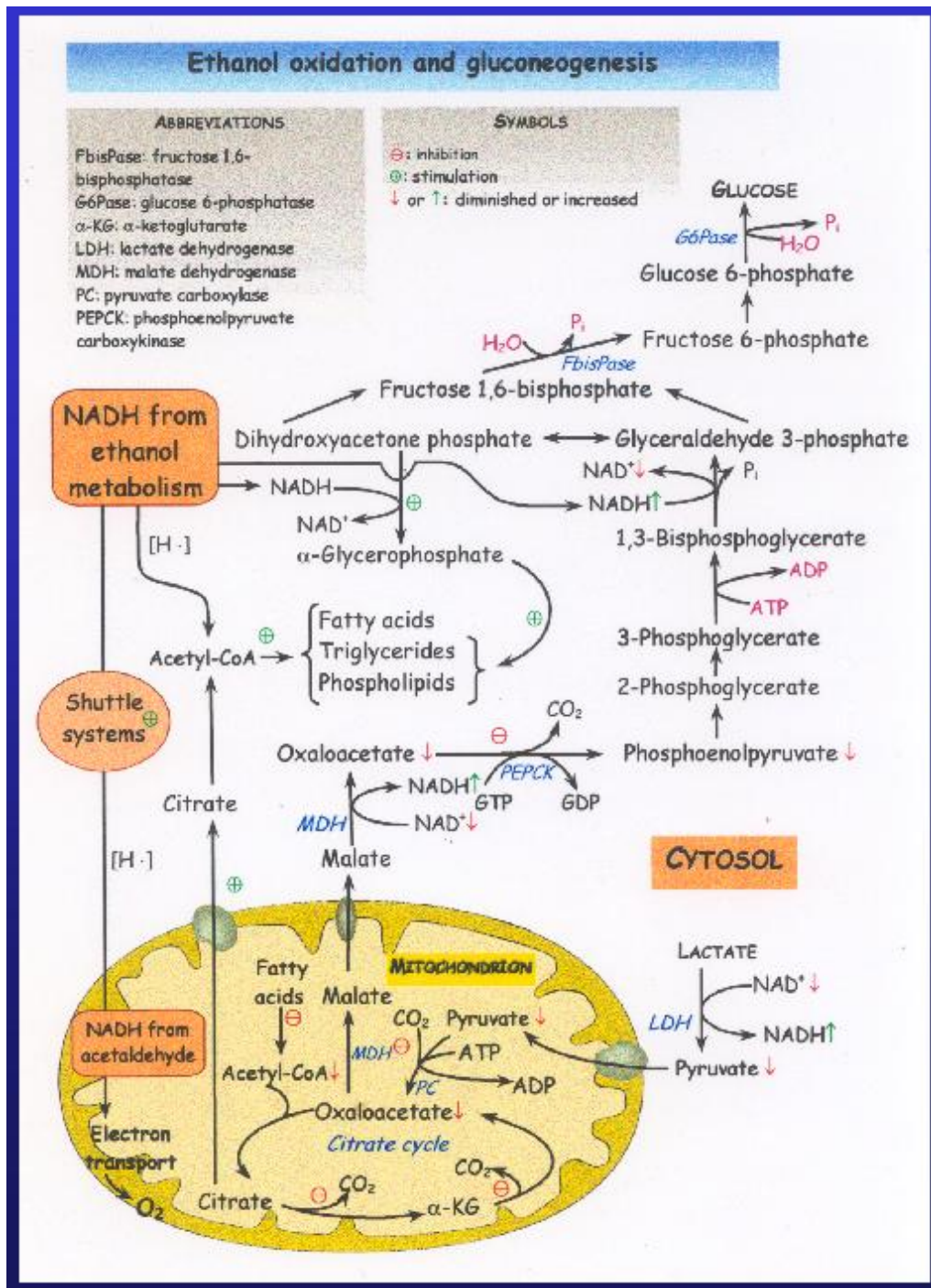
A seguir deve-se abrir o tórax, cortando o esterno, o diafragma e as costelas para exposição completa do coração. Colocam-se duas ligaduras frouxas ao redor da veia cava e aumenta-se o fluxo para 20 ml por minuto. Os vasos em torno do coração incham e isto facilita a inserção superior da cânula da veia cava sem fazer nenhuma incisão. Esta cânula deve ser empurrada até ficar a dois ou três milímetros do fígado. O líquido de perfusão deve agora fluir apenas através dela. As ligaduras anteriormente colocadas ao seu redor devem ser amarradas. Antes de amarrar a ligadura proximal (em relação ao fígado), convém amarrar num mesmo laço as porções anteriormente seccionadas do diafragma. Isto evitará uma torção e o fechamento da veia cava, o que poderá ser fatal para o êxito do procedimento cirúrgico.

Para colocar o fígado na plataforma, no entanto, deve-se removê-lo cortando por baixo do diafragma até uma completa separação do órgão do restante do animal. Convém fazer isto com uma tesoura de pontas arredondadas, prestando muita atenção para não seccionar o fígado. Um auxiliar deverá levantar o rato de tal forma que o fígado tenda a escorregar para baixo e para frente e para que o animal possa ser dobrado para trás à medida que o corte prossegue. Isto facilita o procedimento e a visualização das estruturas. O operador deve segurar a cânula da veia cava através das ligaduras que deverão ser cortadas apenas após o posicionamento definitivo do fígado na câmara. O fluxo não deve ser interrompido durante todo o processo.

Uma vez colocado na câmara do fígado, o fluxo através do órgão deve ser ajustado para valores que permitam oxigenação adequada (entre 4 e 5 ml por minuto por grama de fígado), o que pode ser avaliado a partir da concentração venosa de oxigênio (nunca inferior a 0,15 mM).

O tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato é o líquido de perfusão padrão utilizado na maioria dos experimentos. O pH deste tampão é inicialmente ajustado em 7,6; após saturação com a mistura de oxigênio:dióxido de carbono (95:5%) o pH desce, automaticamente, para 7,4. Substratos, drogas e hormônios podem ser dissolvidos no líquido de perfusão nas concentrações desejadas. Em geral adiciona-se certa quantidade de albumina de soro bovino, que ajuda na manutenção da integridade do órgão.

A gliconeogênese é uma via anabólica responsável pela produção da glicose (em condições metabólicas específicas) a partir de precursores estruturalmente mais simples como piruvato, lactato e alanina. Essa via pode sofrer a influência de certas drogas entre elas o etanol.



O lactato, por exemplo, sofre catabolismo e anabolismo ao mesmo tempo. O anabolismo consiste principalmente na transformação do lactato em glicose. A infusão de lactato levará à formação de piruvato. Uma parte, relativamente pequena, do piruvato será transformada em acetil-CoA. Este último poderá ser degradado no ciclo de Krebs (catabolismo) ou ser transformado em ácidos graxos e colesterol (anabolismo). Os parâmetros mais fáceis de serem medidos neste caso, no entanto, são a produção de glicose e piruvato, e o consumo de oxigênio. A glicose é liberada em sua maior parte porque a velocidade de síntese de glicogênio é muito menor que a produção de glicose. Piruvato é

liberado em sua maior parte porque a velocidade de sua produção é superior à capacidade das células de oxidá-lo na cadeia respiratória. A maior parte do consumo de oxigênio nas células hepáticas se deve à oxidação de ácidos graxos endógenos.

(II) O estudo do fígado em frações celulares

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a sua remoção pelos sistemas de defesa antioxidante. O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de ROS que causa danos moleculares as estruturas celulares com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecido adiposo e cerebral (Halliwell, 1994). No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta. Em humanos, o estresse oxidativo encontra-se ligado a diversas doenças, como a aterosclerose, a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer.

Em condições fisiológicas aproximadamente 1 a 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias é convertido em ROS e radicais livres devido a incompleta redução do oxigênio por reações de transferência de elétrons. As espécies reativas de oxigênio incluem o radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxil ($\text{OH}^{\bullet}$). Estas são em geral eliminadas por um sistema de defesa antioxidante, que consiste de enzimas que varrem radicais livres e moléculas de baixo peso molecular com atividade antioxidante. Quando as ROS escapam do sistema antioxidante, estas causam dano oxidativo lesando macromoléculas como DNA, proteínas, e lipídios, além de mutações no DNA mitocondrial (mitDNA). O mitDNA com lesões oxidativas e com mutações são transcritos e traduzidos em subunidades protéicas defeituosas que compõe a cadeia respiratória. O prejuízo na cadeia respiratória resultam em perda progressiva da síntese de energia (ATP), como também gera mais ROS via vazamento de elétron, e consequentemente maior número de lesões oxidativas e mutações no mitDNA. Este círculo vicioso é acelerado com o avanço da idade resultando em acúmulo de danos em macromoléculas e mutações no mitDNA, levando a um prejuízo mitocondrial e a um progressivo declínio das funções bioenergéticas das células durante o processo de envelhecimento (Linnane et al., 1989; Wei, 1992).

Enquanto algumas formas de ROS podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas. O radical $\text{HO}^{\bullet}$ é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a

insaturações. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares e facilmente gerar o radical hidroxila. Ele somente oxida proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos, por exemplo GSH. Já o radical ânion superóxido ($\bullet O_2^-$) ao contrário da maioria dos radicais livres é inativo. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (Barreiros e David, 2006).

Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA. Se a cadeia do DNA é quebrada, pode ser reconectada em outra posição alterando, assim, a ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente. Ocorrendo na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana, ou ocasiona a ruptura dessa, levando à morte celular. A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral.

O maior sistema antioxidante que protege o organismo contra as ROS é composto por enzimas e moléculas biológicas que são capazes de neutralizar os radicais livres, entre estas incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), além das moléculas glutathione reduzida (GSH), vitamina C e vitamina E. O aumento do dano oxidativo observado por exemplo, durante o envelhecimento, pode ser devido ao insuficiente sistema de defesa antioxidante, assim como também de uma síntese desregulada de radicais livres, os quais promovem danos acumulativos em macromoléculas (Reiter, 1995).

Objetivo

Conhecer metodologias que permitem o estudo dos vias metabólicas bem como do estresse oxidativo.

Para isso, Demonstrar a técnica de perfusão em fígado de rato analisando o efeito do etanol sobre a gliconeogênese hepática e as alterações no estresse oxidativo causadas por essa droga.

Roteiros dos experimentos

(I) Metodologia da perfusão hepática

O procedimento descrito abaixo deverá ser executado com o fígado de animal em jejum prévio de 24 horas. Isto irá minimizar a interferência do catabolismo do glicogênio nos parâmetros medidos.

1. Soluções para a perfusão

1) **Soluções estoque para o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato:** solução **A:** NaCl (2,32 M; concentração final: 116 mM); solução **B:** NaHCO₃ (0,5 M; final: 25 mM); solução **C:** KCl (0,118 M; final: 5,9 mM), Na₂SO₄ (24 mM; final: 1,2 mM), MgCl₂ (23,6 mM; final: 1,18 mM); NaH₂PO₄ (24,8 mM; final: 1,24 mM); solução **D:** CaCl₂ (50 mM; final 2,5 mM).

2) **Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato puro:** tomar 2400 mL de água destilada e 150 mL de cada uma das soluções estoque A, B, C e D, adicionar 0,75 g de albumina e acertar pH para 7,6 (volume final de 3000 mL).

3) **Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato contendo lactato 2 mM:** tomar 1600 mL de tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato puro e dissolver 893 µL de lactato.

4) **Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato contendo lactato 2 mM e etanol 20 mM:** tomar 800 mL de tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato contendo lactato 2 mM e dissolver 932 µL de etanol para uma concentração final igual a 20 mM; e ajustar o pH em 7,6.

2. Soluções para as dosagens

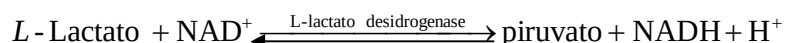
1) **Mistura reagente para a dosagem enzimática de lactato:** 35 ml de tampão glicina 0,1 M/hidrazina 0,4 M a pH 9,0; 0,035 g de NAD⁺; 40 µl da suspensão de lactato desidrogenase.

2) **Reagentes para dosagem de glicose:** reativo de trabalho pronto do *kit*; solução padrão de glicose (0,5 mM).

3. Princípios das dosagens

3.1. Piruvato

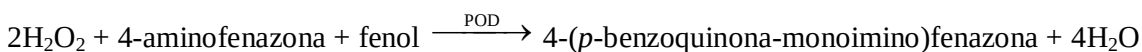
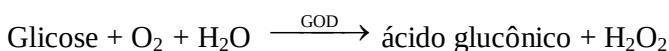
Método enzimático segundo Bergemeyer (1974). A reação catalisada pela lactato desidrogenase (LDH):



Pode-se medir espectrofotometricamente a 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) o desaparecimento de NADH (dosagem de piruvato). O equilíbrio favorece a oxidação do NADH.

3.2. Glicose

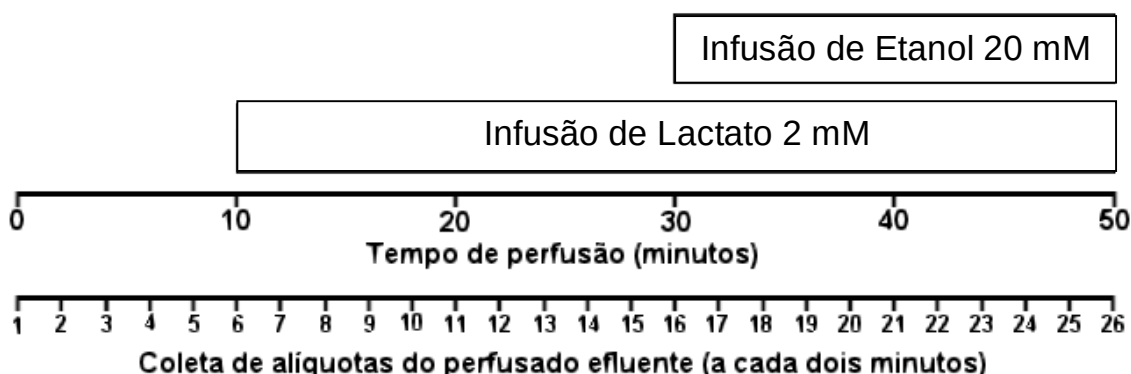
A glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase (GOD) a ácido glucônico e água oxigenada. Esta última, na presença de peroxidase (POD), produz a conjugação do fenol presente na solução com a 4-aminofenazona, dando lugar a um composto colorido que absorve luz a 505 nm. Esquematicamente:



A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra.

4. Protocolo experimental

- 1) Anestesiocar um rato em jejum prévio de 24 horas com tiopental, utilizando uma dose de 50 mg/kg. Injetar intraperitonealmente na forma de solução aquosa (50 mg/ml).
- 2) Isolar o fígado de acordo com o procedimento cirúrgico já descrito.
- 3) Perfundir com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato, de acordo com o esquema abaixo:



- 4) Iniciar a colheita de amostras de 2 ml do perfusado efluente de acordo com o esquema acima, logo após a estabilização do consumo de oxigênio.
- 5) Registrar as variações no consumo de oxigênio.

5. Procedimentos para as dosagens enzimáticas

5.1. Piruvato

Amostras: 0,4 ml da mistura reativa + 0,8 ml de perfusado.

Branco: 0,4 ml da mistura reativa + 0,8 ml de solução de Krebs/Henseleit-bicarbonato.

Deixar em banho-maria a 37°C durante 10 minutos; ler a 340 nm

5.2. Glicose

Amostras: 0,8 mL da mistura reativa + 0,4 mL de perfusado.

Padrão: 0,8 ml da mistura reativa + 0,4 ml de solução padrão de glicose.

Branco: 0,8 ml da mistura reativa + 0,4 ml de solução de Krebs/Henseleit-bicarbonato.

Banho-maria a 37°C por 20 minutos; leitura a 505 nm.

6. Procedimentos para a avaliação da concentração venosa de oxigênio

Um polarógrafo adequado para o registro do consumo de oxigênio pelo fígado deverá ter um sistema de compensação (deslocamento de ponto nulo) para poder operar com grande sensibilidade.

(1) No início o líquido de perfusão está saturado com ar e o registrador mostra uma linha estável que corresponde à concentração de oxigênio de uma solução salina saturada com ar; a 37°C e à pressão atmosférica, esta concentração é aproximadamente igual a 190 μM (237 μM a 25°C); no papel do registrador isto corresponde a x cm desde o ponto nulo (zero na escala da esquerda).

(2) Após a substituição do ar pela mistura carbogênica ($\text{O}_2:\text{CO}_2 \therefore 95:5$), a concentração do oxigênio aumenta e, depois de algum tempo, estabiliza-se em torno de 860 μM ; este valor decorre do fato de que a pressão parcial do oxigênio na mistura carbogênica supera em $95\%/21\% = 4,52$ vezes a pressão parcial no ar (i.e., $190 \mu\text{M} \times 4,52 \approx 860 \mu\text{M}$); a deflexão do registrador ultrapassaria os limites do papel; para que isto não aconteça será necessário compensar, isto é, deslocar o ponto zero no registrador, que passa a situar-se fora do limite do papel.

(3) Depois desses procedimentos o fígado, preparado cirurgicamente conforme descrito, é colocado na câmara.

(4) A concentração do oxigênio no perfusado efluente é agora menor que 860 μM por causa do seu consumo pelas células hepáticas; este consumo tende a ser maior no início, o que corresponde à fase de recuperação da anóxia a que o fígado foi submetida durante a cirurgia. O consumo de oxigênio logo tende a estabilizar-se, no entanto, atingindo um estado estacionário.

(5) A concentração de oxigênio no perfusado venoso neste estado estacionário ou em qualquer outra fase pode ser determinada medindo-se a distância entre o ponto nulo e a posição do traçado da pena e usando a concentração de 190 μM como valor de calibração ao qual corresponde uma distância de x cm entre o ponto zero e o traçado da pena. A distância entre o ponto nulo e a posição do traçado da pena corresponde a z + y, isto é, deve-se levar em conta os deslocamentos de ponto nulo efetuados; a fórmula final será:

$$\text{Concentração venosa de oxigênio } (\mu\text{M}) = \frac{(z \text{ cm} + y \text{ cm}) \cdot 190 \mu\text{M}}{x \text{ cm}}$$

7. Cálculo dos fluxos metabólicos

Os fluxos metabólicos serão expressos em μmol por minuto por grama de fígado ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$).

A fórmula geral para o cálculo nas dosagens espectrofotométricas é:

$$\text{Fluxo metabólico} = \text{fator} \times \text{absorbância}$$

O fator para as dosagens enzimáticas com NAD^+ -NADH é dado por:

$$\text{Fator} = \frac{\text{diluição} \times \text{fluxo (ml/min)}}{6,22 \times \text{peso do fígado (g)}}$$

O fator para a dosagem enzimática da glicose é:

$$\text{Fator} = \frac{\text{fluxo (ml/min)} \times \text{concentração do padrão}}{\text{peso do fígado (g)} \times \text{absorbância do padrão}}$$

Para o **consumo de oxigênio**, a fórmula a ser usada será:

$$\text{Consumo de oxigênio} = \frac{\text{fluxo} \times (\text{concentração arterial} - \text{concentração venosa})}{\text{peso do fígado (g)}}$$

A concentração arterial é constante e igual a $0,86 \mu\text{mol/ml}$ (ou $860 \mu\text{M}$) e a concentração venosa é obtida conforme descrito acima.

8. Resultados

Faça um gráfico mostrando a variação dos fluxos metabólicos em função do tempo de perfusão; assinala com barras horizontais as alterações na composição do líquido de perfusão.

9. Discussão dos resultados

Procure responder e discutir as seguintes questões:

- Quais são as alterações causadas pela infusão do lactato no sistema de perfusão?
- Se tomarmos a liberação da glicose como uma medida da gliconeogênese, qual será a velocidade de consumo de ATP (em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$) nesta via?
- A produção de ATP necessária para suprir a via gliconeogênica é proveniente principalmente de qual processo metabólico?
- Qual é a lógica das alterações provocadas pela infusão do etanol?

(II) Estresse oxidativo

1) Preparação do homogenato de fígado para determinação dos conteúdos de glutathiona reduzida, glutathiona oxidada e níveis de lipoperoxidação

Os conteúdos de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), assim como o nível de peroxidação lipídica serão determinados no homogenato de fígados de ratos. Para a realização destes ensaios, fígados de ratos em jejum serão perfundidos com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato. Após um período de pré-perfusão de 10 minutos, será infundido L-lactato 2 mM por um período de 30 minutos, na ausência ou na presença de etanol 20mM nos últimos 20 minutos. Após a perfusão, o fígado será clampeado em nitrogênio líquido, pesado e separado em duas porções. Cada porção será então homogeneizada com homogeneizador Van Potter em meio de extração específico, de acordo com os metabólitos a serem avaliados.

Para a determinação dos conteúdos de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG), uma pequena porção de fígado (em torno de 3,0 g) será homogeneizada em cerca de 12 ml de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 1,0 mM, Hepes 10 mM (pH 7,2), mantido resfriado (**H1**). Para a avaliação dos níveis de lipoperoxidação, outra porção do fígado (3,0 g) será homogeneizada em cerca de 12 ml de KCl 1,15% mantido resfriado (**H2**). Em ambos os casos, será realizada a dosagem de proteínas.

2) Dosagem Fluorimétrica de GSH

A concentração de GSH será determinada fluorimetricamente, conforme descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas modificações. A pH 8,0, a GSH reage com *o*-ftalaldeído (OPT) produzindo um produto fluorescente. Assim, para a realização destes ensaios, alíquotas de 25 µl de homogenato (**H1**) serão adicionados a frascos Eppendorf, contendo 1,0 ml de meio contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e Hepes 10 mM, pH 7,4 (**Meio de precipitação**). A esta mistura serão adicionados 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) 15%. Após centrifugação a $10.600 \times g$ (9800 rpm) por 3,0 minutos, o conteúdo de GSH será dosado, através da adição de alíquotas de 100 µl de sobrenadante a 2 ml de tampão fosfato 0,1 M + EDTA 5,0 mM (TPE), pH 8,0. Para avaliação do conteúdo de GSH, serão realizados padrões, através da adição de 40 µl de GSH 1,0 mg% (dissolvido em água) e brancos, através da adição de 100 µl de água destilada em 2mL de TPE.

A adição de 100 µl de *o*-ftalaldeído 1 mg/mL (OPT – preparado em metanol), resulta na formação de um produto altamente fluorescente, com o máximo de fluorescência sendo obtido após

cerca de 15 minutos, em temperatura ambiente. Após este período, o fluoróforo GSH-OPT, que apresenta um pico de ativação a 350 nm e um pico de emissão de fluorescência a 420 nm, será dosado em espectrofluorímetro.

Após a realização da primeira leitura, uma segunda leitura será realizada 15 minutos após a adição, às amostras, de 40 µl de GSH 1,0 mg%; esta segunda leitura, tem como finalidade eliminar interferências, causadas pela presença de proteínas, sobre a fluorescência do composto GSH-OPT (*quenching*). Assim, a quantidade de GSH existente no tecido hepático será calculada de acordo com a fórmula:

$$Q_{\text{GSH}} = \left[C_{\text{padrão}} \times \left(\frac{F_{\text{Am}} - F_{\text{Bco}}}{F(\text{Padrão} + \text{Amostra}) - F_{\text{Am}}} \right) \right] \times \frac{15}{\text{mg de proteína do homogenato}}$$

onde:

$C_{\text{padrão}}$ = Concentração de padrão GSH, ou seja, 0,4 µg (40 µl de GSH 1,0 mg%).

F_{Am} = Fluorescência da Amostra.

F_{Bco} = Fluorescência do Branco.

$F(\text{Padrão} + \text{Amostra})$ = Fluorescência do padrão + Fluorescência da Amostra.

$$Q_{\text{GSH}} = \left[0,4 \mu\text{g} \times \left(\frac{F_{\text{Am}} - F_{\text{Bco}}}{F(\text{Padrão} + \text{Amostra}) - F_{\text{Am}}} \right) \right] \times \frac{15}{\text{mg de proteína do homogenato}}$$

Desta forma, a concentração de GSH será expressa em termos de µg de GSH por miligrama de proteína presente no homogenato (**H1**).

3) Dosagem Fluorimétrica de GSSG

A concentração de GSSG será determinada fluorimetricamente, também conforme descrito por Hissin e Hilf (1976), com algumas modificações. Assim, para a realização destes ensaios, alíquotas de 50 µl de homogenato (**H1**) serão adicionados a frascos Eppendorf, contendo 1,0 ml do mesmo meio de precipitação utilizado na técnica de GSH. A esta mistura serão adicionados 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) 15%. Após a centrifugação a $10.600 \times g$ (9800 rpm), por 3,0 minutos o conteúdo de GSSG será dosado, através da adição de alíquotas de 500 µl de sobrenadante a 200 µl de NEM 0,04 M (N-etilmaleimida). As amostras serão mantidas em temperatura ambiente

e após 30 minutos serão adicionados 4.3 ml de NaOH 1 M. Alíquotas de 100 µl dessa solução serão adicionadas a tubos de ensaio contendo 1.8 ml de NaOH 1M. Para a determinação da concentração de GSSG também serão realizados padrões de GSSG, através da adição de 40 µl de GSSG 1,0 mg% (dissolvido em água) em 1.8 ml de NaOH 1M e brancos, através da adição de 100 µl de água destilada em 1.8 ml de NaOH 1M.

Posteriormente, serão adicionados 100 µl de *o*-ftalaldeído 1 mg/mL que resulta na formação de um produto altamente fluorescente, com o máximo de fluorescência sendo obtido após cerca de 15 minutos, em temperatura ambiente. Após este período, o fluoróforo GSSG-OPT, que apresenta um pico de ativação a 350 nm e um pico de emissão de fluorescência a 420 nm, será dosado em espectrofluorímetro.

Após a realização da primeira leitura, serão adicionados 40 µl de GSSG 1,0 mg% aos tubos de amostras, e após 15 minutos será realizada uma segunda leitura; esta segunda leitura, tem como finalidade eliminar interferências, causadas pela presença de proteínas, sobre a fluorescência do composto GSSG-OPT (*quenching*). Assim, a quantidade de GSSG existente no tecido hepático será calculada também de acordo com a fórmula para conteúdo de GSH, considerando-se uma diluição na quantidade de proteína de dez vezes.

4) Determinação dos níveis de lipoperoxidação de membranas

A lipoperoxidação será determinada utilizando o método do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBA), pelas quantidades de malonaldeído produzidas (Ohkawa et al, 1979). O malonaldeído (MDA) – produto secundário da peroxidação lipídica – reage colorimetricamente com TBA e pode ser dosado espectrofotometricamente a 532 nm. Para dosagem de MDA, 50 µL de homogenato (H2) serão adicionados a tubos de vidro com capacidade de 10 mL e com rosca, contendo 150 µL de água bidestilada (diluição de 4 vezes). Serão realizados tubos-padrões – através da diluição de 100 µL de MDA 200 µM em 100 µL de água bidestilada – e tubos-branco, os quais conterão 200 µL de água. Em seguida, serão adicionados aos tubos branco, padrão e àqueles contendo amostras, 200 µL de SDS 8,1%, 1,5 mL de ácido acético 20%, 1,5 mL de TBA 0,67% e 96 µL de água bidestilada. Os tubos serão então homogeneizados delicadamente e incubados a 95°C por 60 minutos. Após o período de incubação os tubos serão resfriados em banho de gelo e o complexo MDA-TBA será então extraído com 4 mL de *n*-butanol-piridina (15:1). Após agitação em vórtex e centrifugação a $2.340 \times g$ (4.600 rpm), por 10 minutos, a absorbância da fase orgânica (superior) será medida em espectrofotômetro a 532 nm. A quantidade de MDA existente nas

amostras será determinada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do TBA de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, de acordo com a seguinte fórmula:

$$Q_{\text{MDA}} = \frac{\text{Abs Am}}{\varepsilon} \times \frac{4,0}{\text{mg de ptna}}$$

Onde

Q_{MDA} = Quantidade de MDA

ε = Coeficiente de extinção molar do TBA

A quantidade de MDA existentes na amostra será então expressa em termos de nmol de MDA $\times$ mg de peso úmido do fígado⁻¹.

5) Guia Prático

1. *Preparação do Homogenato de fígado*

- ✓ Pesar aproximadamente uma porção de fígado (3 g) e homogeneizar em 12 ml do meio de extração para dosagem de GSH e GSSG utilizando um homogeneizador Van Potter:

Meio de extração do homogenato para dosagem de GSH e GSSG (H1)

Solução estoque	Volume (mL)	Concentração final (mM)
Sacarose 2M	7,25	250
EGTA 0,2M	0,25	1
HEPES 0,5M	1	10
Água q.s.p 50ml	42,5	---
Ajustar pH = 7,2		

- ✓ Outra porção de fígado (3 g) deverá ser homogeneizada em meio de KCl 1,15% para dosagem de TBARS:

Meio de extração do homogenato para TBARS (H2)

KCL 1,15%

2. Procedimento para a dosagem de proteínas

No dia do experimento, misturar os reativos **a**, **b** e **c**, na seguinte ordem e volumes: 0,2 ml de **b**, 0,2 ml de **c** e 20 ml de **a** (rigorosamente nesta ordem).

Diluir o homogenato 1 e 2, 100 vezes (990 µL de água + 10 µL da amostra do homogenato).

✓ Adicionar em tubos de ensaio (Triplicata)

Dosagem de proteínas			
	Branco	Padrão	Amostra
Água	100µL	-	-
Padrão	-	100 µL	-
Amostra diluída	-	-	100 µL
Mistura reativa	1000 µL	1000 µL	1000 µL
AGITAR CADA TUBO E AGUARDAR 10 MIN. (AMBIENTE)			
Folin 1N	100 µL	100 µL	100 µL
AGITAR CADA TUBO E AGUARDAR 10 MIN. (AMBIENTE)			

Após os 10 minutos em temperatura ambiente, realizar a leitura das amostras e padrão, em espectrofotômetro a 700 nm, contra o branco.

A concentração de proteína será calculada com base na absorbância encontrada para o padrão albumina 20 mg%.

3. Dosagem Fluorimétrica de GSH

✓ Adicionar em Eppendorf

- o 25µL de homogenato (H1)
- o 1mL de meio de precipitação
- o 500µL de TCA 15%
- o CENTRIFUGAR POR 3 MINUTOS – 9800rpm

Meio de precipitação		
Solução estoque	Volume (mL)	Concentração final (mM)
Sacarose 2M	1,562	125
KCL 1M	1,625	65
HEPES 0,5M	0,5	10
Água q.s.p 25ml	21,312	---
Ajustar pH = 7,4		

- ✓ Adicionar em tubos de ensaio pequenos

	Branco	Padrão	Amostra
TPE (pH 8,0)	2ml	2ml	2ml
Água	100µL	60µL	-
Padrão	-	40µL	-
Amostra	-	-	100µL
OPT	100µL	100µL	100µL

Após adicionar OPT em todos os tubos, aguardar 15 minutos e realizar leitura no fluorímetro (350 excitação; 420 emissão).

Após realizar a leitura, adicionar 40µL de padrão GSH nas amostras, aguardar 15 minutos, e realizar leitura novamente.

4. Dosagem Fluorimétrica de GSSG

- ✓ Adicionar em Eppendorf
 - o 50µL de homogenato (H1)
 - o 1mL de meio de precipitação da técnica do GSH
 - o 500µL de TCA 15%
 - o CENTRIFUGAR POR 3 MINUTOS – 9800rpm

- ✓ Adicionar em tubos de ensaio grandes (MIX)

- o 200 µL de NEM
- o 500 µL de sobrenadante

Incubar por 30 minutos em temperatura ambiente e adicionar:

- o 4,3 ml de NaOH 0,1M.

- ✓ Adicionar em tubos de ensaio pequenos

	Branco	Padrão	Amostra
NaOH 0,1M	1.8ml	1.8ml	1.8ml
Água	100µL	60µL	-
MDA 200 µM	-	40µL	-
Amostra (MIX)	-	-	100µL
OPT	100µL	100µL	100µL

Após adicionar OPT em todos os tubos, aguardar 15 minutos e realizar leitura no fluorímetro (350 excitação; 420 emissão).

Após realizar a leitura, adicionar 40µL de padrão GSSG nas amostras, aguardar 15 minutos, e realizar leitura novamente.

5. Determinação dos níveis de lipoperoxidação de membranas (TBARS)

- ✓ Adicionar a todos os tubos de vidro com rosca

	Branco	Padrão	Amostra
Ácido acético 20%	1,5ml	1,5ml	1,5ml
TBA 0,67%	1,5ml	1,5ml	1,5ml
SDS 8,1%	200µL	200µL	200µL
Água	600µL	600µL	600µL
AGITAR TODOS OS TUBOS			
Água	200µL	100µL	150µL
Padrão de MDA	-	100µL	-
Amostra (H2)	-	-	50 µL
AGITAR TODOS OS TUBOS E INCUBAR POR 60 MIN. A 95°C			

- ✓ Adicionar em todos os tubos cônicos com rosca
 - o 4mL de butanol-piridina
- ✓ Após a incubação em banho maria os tubos com rosca serão rapidamente resfriados e o conteúdo será transferido para os tubos cônicos contendo butanol-piridina.
- ✓ Agitar os tubos cônicos no vortex e centrifugar a 4600 rpm por 10 minutos.
- ✓ Pipetar a fase orgânica (superior) em tubos de ensaio (1ml aprox.) e realizar leitura em espectrofotômetro a 532nm (LEITURA CONTRA BUTANOL).

REFERÊNCIAS

BRACHT A, ISHII-IWAMOTO EL, KELMER-BRACHT AM (2003). O estudo do metabolismo no fígado em perfusão. In: Bracht A, Ishii-Iwamoto EL (eds), Métodos de Laboratório em Bioquímica, Manole, São Paulo, pp. 275–289.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. Editora Savier, Quarta Edição, 2007.

HISSIN PJ, HILF R. A fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Analyt Biochem*, 1976; 74:214-226.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analyt Biochem*, 1979; 95:351-358.

LOWRY, OH.; ROSEBROUGH, NJ; FARR, AL & RANDALL, RJ (1982) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:131-138.

HALLIWELL, B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition reviews*, 52:253-265.

LINNANE, A. W., MARZUKI, S., OZAWA, T. TANAKA, M. (1989). Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative disease. *Lancet* 1, 642-645.

WEI, Y. H. (1992). Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutat. Res.* 275, 145-155.

REITER, R.J. (1995). Oxidative process and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB Journal*, 9:526-533.

TÉCNICAS DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR PARA ESTUDOS DE CONTROLE QUÍMICO E BIOLÓGICO EM INSETOS PRAGAS

Adriana A. S. Gigliolli
Gislei Rigoni
Géssica de Sousa
Fúlvio Zanete Paixão
Prof. Dr. Hélio Conte
Prof^a. Dra. Ana Silvia Lapenta

INTRODUÇÃO

Os insetos constituem o maior e mais diverso grupo de animais na Terra. Apresentam cerca de 1 milhão de espécies identificadas ocupando os mais diferentes nichos ecológicos como vegetais, solo e águas, sendo os seus principais representantes agrupados nas Ordens Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera e Lepidoptera (Gallo et al., 2002).

Além dos inúmeros benefícios como polinização e produção de alimentos, servem também de alimento para diversas espécies de pássaros, peixes, anfíbios e mamíferos. No entanto, alguns representantes acarretam enormes prejuízos às plantas, aos animais domésticos e, conseqüentemente, ao próprio homem, seja pela transmissão de microorganismos causadores de doenças ou pelos danos econômicos causados devido à infestação de pragas na agricultura ou produtos armazenados.

Para minimizar esses danos causados por alguns insetos à agricultura, animais e ao homem, métodos eficazes devem ser utilizados no controle dessas espécies. O controle químico, realizado por meio da aplicação de inseticidas sintéticos incluindo os organofosforados, piretróides e carbamatos, é a estratégia mais utilizada (Beckel et al., 2006). No entanto, o uso indiscriminado destes compostos, tem contribuído para que os insetos desenvolvam mecanismos de resistência, que permitem a eles, suportarem doses cada vez maiores de compostos que seriam letais para a maioria dos indivíduos da população (Subramanyam e Hagstrum, 1996).

Existem basicamente três mecanismos envolvidos na resistência a inseticidas. Os fisiológicos que incluem alterações nos sítios de ação dos inseticidas, os comportamentais nas quais os insetos se tornam capazes de reconhecer e evitar superfícies tratadas com inseticidas, e, a detoxificação metabólica, que resulta no aumento da síntese ou mudança estrutural em enzimas como as oxidases de funções mistas, transferases e as esterases (Beckel et al., 2006).

Esses mecanismos de resistência têm sido documentados para várias espécies. Dentre eles, populações de *Oryzaephilus surinamensis* (Lee e Lees, 2001), *Cryptolestes ferrugineus* (Spencer et al., 1998), *Tribolium castaneum* (Subramanyam et al., 1989; Haubruge et al., 2002), *Bactrocera*

dorsalis (Hsu et al., 2006) e *Rhyzopertha dominica* (Guedes et al., 1997) resistentes a organofosforados, bem como, populações de *Tribolium castaneum* (Collins, 1990, 1992), *Rhyzopertha dominica* (Lorini e Galley, 1999), *Aedes aegypti* (Rodríguez et al., 2003) e *Sitophilus zeamais* (Ribeiro et al., 2003) resistentes aos piretróides.

Além do surgimento de linhagens resistentes, a permanência de resíduos tóxicos nos alimentos, o alto poder de bioacumulação no ambiente e a baixa seletividade destes inseticidas químicos, tem motivado os pesquisadores a utilizarem o controle biológico de pragas, devido aos menores impactos causados ao homem e ao ambiente (Aguiar-Menezes, 2005).

Neste contexto, as plantas que foram amplamente utilizadas no combate aos insetos até a descoberta dos inseticidas sintéticos na primeira metade do século passado (Costa, Silva e Fiuza, 2004), ressurgem como opção para o controle de insetos. Mais de 2000 espécies de vegetais, incluindo as pertencentes às famílias Asteraceae, Labiateae, Piperaceae, Annonaceae e Meliaceae, apresentam propriedades inseticidas conhecidas (Shekari, et al., 2008).

De acordo com o modo de ação, esses compostos naturais têm sido classificados como análogos hormonais de insetos, repelentes e deterrentes. Os análogos hormonais dos insetos incluem compostos que demonstraram interferir na atividade do hormônio juvenil, responsável pela metamorfose dos insetos. Deste modo, a ecdise pode ser completamente inibida ou ocorrer de modo incompleto, produzindo indivíduos com características intermediárias ou com deformações morfológicas que dificilmente sobreviverão (Mordue e Nisbet, 2000).

Os repelentes, geralmente compostos terpenóides (óleos essenciais), na maioria das vezes, apresentam odores característicos que servem para repelir os insetos (Harborne, 1982).

A deterrência é um mecanismo que depende da integração do sistema nervoso central com os quimiorreceptores localizados nos tarsos, peças bucais e cavidade oral dos insetos (Mordue e Nisbet, 2000). Segundo esses autores, o contato dessas estruturas receptoras com as substâncias deterrentes (terpenóides, curcubitacinas e flavonóides), desencadeia mecanismos fisiológicos que provocam a redução no consumo de alimentos. Prejudica também a utilização dos alimentos ingeridos, reduzindo a eficiência de conversão alimentar, e, a atividade das enzimas do mesentério ou intestino médio, o que conseqüentemente leva à deficiência nutricional (Martinez e Van Emden, 1999). Isto compromete vários processos fisiológicos, incluindo o crescimento e o desenvolvimento (Mordue e Blackwell 1993; Mordue e Nisbet 2000) cujos efeitos podem incluir o alongamento de fases do ciclo biológico, deformações e a própria morte dos insetos (Costa, Silva e Fiuza, 2004).

Vários trabalhos demonstraram o efeito deterrente sobre os insetos, os quais incluem extratos de *P. nigrum* (pimenta do reino), *Melia azedarach* (santa-bárbara) e *Crocus sativus* (açafrão) sobre o bicudo do algodoeiro, o coleóptero *Anthonomus grandis* (Fernandes et al., 1996), extratos de *Melia Azedarach* sobre larvas e adultos de *Xanthogalleruca luteola* (Valladares et al.,

1997), extratos de neem sobre *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens), *Sitophilus oryzae* (L.), *Tribolium castaneum* (Herbst) (Xie et al., 1995) *Rhizopertha dominica* (Rahim et al., 1998) e *Spodoptera litura* (F.) (Huang et al., 2004).

Tendo em vista que os compostos químicos ou biológicos interferem na ultraestrutura, composição bioquímica, bem como, em outros aspectos comportamentais e biológicos durante o ciclo de vida do inseto, várias técnicas de biologia celular e molecular tem sido empregadas para o estudo da biologia, comportamento, fisiologia e controle de insetos praga.

Sendo assim, aliados ao que temos de mais moderno na área de biologia molecular, não podemos negligenciar a importância das técnicas de microscopia no estudo da morfologia e ultraestrutura, fundamentais para identificarmos anormalidades causadas pelos inseticidas, os quais são conhecimentos essenciais que visam contribuir para o melhoramento dos programas de controle de insetos considerados pragas.

OBJETIVOS

- Estudar o ciclo de vida dos insetos por meio da identificação das diferentes fases de desenvolvimento (ovos, larvas, pupas e adultos);
- Analisar a morfologia externa e interna dos insetos;
- Avaliar alterações morfológicas e histológicas causadas por inseticidas sintéticos e naturais nos insetos;
- Verificar a expressão das esterases após exposição a inseticidas químicos e/ou biológicos e o envolvimento dessas enzimas em mecanismos de resistência.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Material biológico

Serão utilizados insetos de diferentes ordens (Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera) visando demonstrar as diferenças morfológicas externas entre os representantes que serão analisados.

2- Identificação das fases de desenvolvimento dos insetos

Os insetos serão anestesiados com éter e colocados em placa de petri para análise em microscópio estereoscópio e identificação das diferentes fases do desenvolvimento: ovos, larvas, pupas e adultos (Dossi et al, 2006).

3- Análises morfológicas e histológicas dos insetos

Os insetos serão analisados com o auxílio de estereomicroscópio e do microscópio de Luz para realização de estudos morfológicos (externos e internos).

Para os estudos morfológicos, os insetos serão anestesiados com éter e dissecados em placa de Petri, seguindo-se a identificação dos órgãos internos. Alguns órgãos deverão ser isolados, depositados em lâminas de vidro e corados com Verde Luz utilizando-se a técnica de montagem total ou Whoule mont (Dossi et al, 2006). Em seguida, serão desenhados e fotografados com câmera digital para montagem de pranchas anatômicas. As alterações morfológicas causadas em insetos previamente expostos a inseticidas (sintéticos ou naturais), com base na metodologia descrita por Moreira et al. (2007), também serão observadas.

Para os estudos histológicos, o processo de preparação seguido de fixação, desidratação, diafanização, embebição em parafina, emblocamento, toilette, microtomia, coleta de cortes será demonstrado seguindo os tratamentos convencionais. Técnicas rotineiras de coloração com Hematoxilina/Eosina serão observadas em lâminas permanentes utilizando-se microscópio de luz (Rigoni et al., 2004). Análises de eletromicrografias processadas de diversos órgãos também serão avaliadas e discutidas (Pinheiro et al., 2008)

Como forma alternativa de estudos histológicos e histoquímicos, será realizada uma explanação do uso da técnica de inclusão em glicol metacrilato (historesina JB4 da Polyscinces) e Microscopia Eletrônica de Varredura (Rigoni et al., 2004).

4- Eletroforese em gel de poliacrilamida para determinação de esterases

Neste trabalho será empregado o gel vertical de poliacrilamida em sistema descontínuo (Laemmli, 1970). Este é resultante da polimerização entre a acrilamida e seu comonômero de ligação cruzada a bisacrilamida, na presença de persulfato de amônia e tetrametiletenodiamina (TEMED).

Para a determinação de esterases, será utilizado o macerado do inseto (larvas e/ou adultos (sobreviventes ao tratamento com inseticida) em tampão de amostra constituído por Tris-HCl e glicerol. Um volume do sobrenadante do macerado amostra será aplicado no gel. Como controle serão utilizados os insetos mantidos nas mesmas condições experimentais, submetidos ao tratamento somente com água.

Os géis serão submetidos à corrida eletroforética, a uma voltagem constante, utilizando-se para o preenchimento dos compartimentos superiores e inferiores da cuba, o tampão Tris-glicina.

Para a identificação das esterases, os géis serão pré-incubados em tampão fosfato. Após 30 minutos o tampão será retirado e adicionado a solução de coloração composta por tampão fosfato, n-propanol, pelo corante Fast Blue RR Salt e pelos substratos α -naftil acetato e β -naftil acetato, previamente solubilizados em acetona. Após 1 hora de incubação no escuro à temperatura ambiente, as esterases serão visualizadas nos géis como bandas pretas ou vermelhas, indicativas da presença de α e β -esterases, respectivamente.

A técnica empregada para secagem dos géis será baseada no método de Ceron et al (1992). Os géis serão banhados em solução de gelatina comercial a 5%, prensados em um bastidor entre duas folhas de papel celofane e deixados a temperatura ambiente para secagem.

REFERÊNCIAS

AGUIAR-MENEZES, E. L. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Documentos, 205. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58p.

BECKEL, H. S.; LORINI, I.; LAZZARI, S. M. N. Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitroton. Revista Brasileira de entomologia, v. 50, n.1, p.110-114, 2006.

CERON, C. R.; SANTOS, J. R.; BICUDO, H. E. M. C. The use of gelatin to dry cellophane wound slab gels in an embroidering hoop. Rev. Brasil. Gen, v. 15, n.1, p. 201-203, 1992.

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Efeitos, Aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. Acta Biological leopoldensia, v. 26, n.2, p. 173-185, jul/dez, 2004.

COLLINS, P. J. A new resistance to pyrethroids in *Tribolium castaneum* (Herbst). Pesticid in Science, v. 28, p. 101-115, 1990.

DOSSI, F. C. A. ; CONTE, H. ; ZACARO, A. A. . Histochemical characterization of the embryonic stages in *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae). Annals of the Entomological Society of America ^{JCR}, v. 99, p. 1206-1212, 2006.

FERNANDES, W.D.; FERRAZ, J.M.G.; FERRACINI, V.L., HABIB, M.E.M. Deterência alimentar e toxidez de extratos vegetais em adultos de *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera:Curculionidae). An. Soc. Entomol. Bras., v. 25, p.553-556, 1986.

GUEDES, R. N. C.; KAMBHAMPATI, S.; DOVER, B.A.; ZHU, K.Y. Biochemical mechanisms of organophosphate resistance in *Rhyzopertha domminica* (Coleoptera: Bostrichidae) populations from the United States and Brazil. Bulletin of Entomological Research, v. 87, p. 581-586, 1997.

HAUBRUGE, E.; AMICHOT, M.; CUANY, A.; BERGE, J.B.; ARNAUD, L. Purification and characterization of a carboxylesterase involved in malathion-specific resistance from *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 32, p. 1181-1199, 2002.

HARBORNE, J. B. Introduction to ecological biochemistry. 2nd ed. London: Academic Press, 1982.

HUANG, R.C.; TADERA, K.; YAGI, F.; MINAMI, Y.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, I.; NAKATANI, M. Limonoids from *Melia azedarach*. Phytochemistry, v. 43, p. 581-583, 1996.

HSU, J-C.; HAYMER, D.S.; WU, J-W.; FENG, H-T. Mutations in the acetylcholinesterase gene of *Bactrocera dorsalis* associated to organophosphorus insecticides. Insect Biochemistry and Molecular biology, v. 36, p. 396-402, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v. 227, p. 680-685.

LEE, S. E.; LEES, E. M. Biochemical mechanisms of resistance in strains of *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) resistant to malathion and chlorpyrifos-methyl. Journal of Economical Entomology, v. 94, p. 706-713, 2001.

LORINI, I.; GALLEY, D.J. Delthamethrin resistance in *Rhizopertha dominica* (F.) (Coleoptera:Bostrichidae), a pest of stored grain in Brazil. Journal of Stored Products Research, v. 35, p. 37-45, 1999.

MARTINEZ, S. S.; VAN ENDEM, H. F. Sublethal concentrations of azadirachtin affect food intake, conversion efficiency and feeding behaviour of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). Bulletin of Entomological Research, v.89, p.65-71, 1999.

MORDUE, A. J. L.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. Journal of Insect Physiology, v. 39, p. 903-924, 1993.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; NISBET, A.J. Azadirachtin from de neem tree *Azadirachta indica*: its actions against insects. An. Soc. Entomol. Bras., v. 29, p. 615-632, 2000.

MOREIRA, M. D.; PICANÇO, M. C.; BARBOSA, L. C. A.; GUEDES, R. N. C.; CAMPOS, M. R. C.; SILVA, G. A.; MARTINS, J. C. Plants compounds insecticide activity against Coleoptera pests of stored products. Pesq. Agrop. Bras., v. 42, n. 7., p. 909-915, 2007.

PINHEIRO, D. O. ; CONTE, H. ; GREGÓRIO, Elisa Aparecida . Spherites in the midgut epithelial cells of the sugarcane borer parasitized by *Cotesia flavipes*. Biocell (Mendoza)^{JCR}, v. 32, p. 123-130, 2008.

RAHIM, M. Biological activity of azadirachtin-enriched neem extracts againts *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat. J. Stored Prod. Res.,v. 34, n. 2/3, p. 123-128, 1998.

RIBEIRO, B. M.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E.; SANTOS, J. P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Sotored Prodcets Research, v. 39, p. 21-31, 2003.

RIGONI, G. M. ; TOMOTAKE, M. E. M. ; CONTE, H. . Morphology of Malpighian tubules of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera; Crambidae) at final larval development. Cytologia^{JCR}, Japan, v. 69, n. 1, p. 1-6, 2004.

RODRIGUÉZ, M.M.; BISSET, J.A.; DIAZ, C.; SOCA, S.A. Resistência cruzada a piretróides em *Aedes aegypti* de Cuba inducido por lá selección con el insecticida organofosforado malation. Rev. Cubana Méd Trop., v. 55, p.105-111, 2003.

SHEKARI, M.; SENDI J. J.; ETEBARI, K.; ZIBAE, A.; SHADPARVAR, A. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteraceae) on nutrition physiology and enzymes activities of elm leaf beethe, *Xanthogaleruca luteola* Mull. (Coleoptera: Chrysomellidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 91, p. 66-74, 2008.

SPENCER, A.G.; PRICE, N.R.; CALLAGHAN A. Malathion-spezif resistance in a strain of the rust red grain beetle *Cryptolestes ferrugineus* (Coleptera:Cucujidae). Bulletin of Entomological Research, v. 88, p. 199-206, 1998.

SUBRAMANYAM, B.H.; HAREIN, P.K.; CUTKOMP, L.K. Organophosphate resistance in adults of red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and sawtoothed grain beetle (Coleoptera: Cucujidae)

infesting barley stored on farms in Minnesota. *Journal of Economic Entomology*, v. 82, p. 989-995, 1989.

SUBRAMANYAN, B.H., HAGSTRUM, D.W., 1996. Resistance measure and management, p. 331-397. In: Subramanyan, B.H., Hagstrum, D.W. (Eds.). *Integrated management of insects in stored products*. New York, Marcel Dekker Inc.

XIE, Y.S.; FIELDS, P.G.; ISMAN, M.B. Repellency and toxicity of azadirachtin and neem concentrates to three stored-product beetles. *Journal of Economic Entomology*, v. 88, p. 1024-1031, 1995.

VALLADARES, G.; DEFAGO, M.T.; PALACIOS, S.; CARPINELLA, M.C. Laboratory evaluation of *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts against the elm leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.*, v. 90, p. 747-750, 1990.

MÉTODOS EXPERIMENTAIS PARA O ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Profª Dra. Ciomar A. Bersani Amado
Dra. Renata Grespan
Carmem Patrícia Barbosa Lopes
Alessandra Mileni Versuti Ritter
Camila Fernanda Estevão da Silva
Raquel Kummer

INTRODUÇÃO

A inflamação é definida como um processo fisiopatológico frente a estímulos lesivos com conseqüente alterações vasculares, celulares e linfáticas. Caracteriza-se por eritema, edema, calor, dor e em alguns casos, perda de função (SOUZA, 2008; HANSEL e DINTZIS, 2007; RAMY et al., 2005).

O agente desencadeador da resposta inflamatória é a agressão tecidual que pode ser de origem biológica (microorganismos), física (mecânica, radiação ou temperatura) ou química (substâncias químicas ambientais, drogas). Todavia, a magnitude da resposta inflamatória é relativamente inespecífica, pois depende tanto da intensidade e duração do estímulo, quanto das características próprias do organismo lesado (BABU, PANDIKUMAR e IGNACIMUTHU, 2009; SILVA, 2006; CLAUDINO, 2006; CAMARGO, 2006; RAMY et al, 2005; TRACEY, 2002).

Durante a resposta inflamatória, cujo principal objetivo é proteger o organismo e reparar danos, ocorre mudança no fluxo sanguíneo (causado por alterações vasculares, com conseqüente vasodilatação), alterações na permeabilidade vascular (provocadas pela contração do citoesqueleto nas células endoteliais), migração de leucócitos para o sítio de inflamação e fagocitose (FILHO, 2006).

No desenvolvimento das reações inflamatórias estão envolvidas várias substâncias como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, mediadores lipídicos e seus derivados, mediadores vasoativos liberados por leucócitos e produtos de sistemas enzimáticos (ROITT, BROSTOFF e MALE, 2003; SILVA, 2004). No entanto, a destruição do agente causal e reparo celular devem ocorrer de maneira eficiente e sincronizada, pois caso contrário, pode gerar uma lesão tecidual e acúmulo de leucócitos, colágeno e outras substâncias que culminam com efeitos prejudiciais ao organismo (DUNG et al., 2009; NATHAN, 2002). Isto porque, a ação persistente de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e fator de necrose tumoral (TNF), contribui para a proliferação, diferenciação e ativação de células do sistema imune levando a um acúmulo das mesmas e ocasionado doenças inflamatórias crônicas (YOON et al., 2008).

A inflamação pode ser dividida em diferentes categorias, sendo cada uma delas mediadas por mecanismos diferentes. A fase inicial é caracterizada por alterações vasculares, se inicia de maneira abrupta e é conhecida como resposta inflamatória aguda. Nesta, três eventos são relevantes: sinalização de calor e rubor devido à vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo local, aumento da permeabilidade vascular levando a um extravasamento de proteínas e líquidos plasmáticos para o meio extravascular e liberação de substâncias pró-inflamatórias que participam no processo de recrutamento celular (TAMURA et al., 2009; WEBSTER, 2003; YOSHIKAI et al., 2001; GOODMAN e GILMAN, 2003).

Dentre as principais alterações vasculares que ocorrem nesta fase, podem ser citadas as alterações no fluxo e no calibre dos vasos e o aumento da permeabilidade vascular. Imediatamente após a lesão, ocorre uma vasoconstrição das arteríolas, a qual é muito rápida e seguida por uma vasodilatação, com conseqüente formação de eritema e calor. O aumento da permeabilidade vascular com o extravasamento e exsudação de líquido para o interstício induz à formação de edema (SOUZA, 2008; SILVA, 2006; CAMARGO, 2006; KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005). O extravasamento de líquido causa um aumento da viscosidade sanguínea levando ao acúmulo de hemácias nos pequenos vasos - processo denominado de estase. Após o desenvolvimento desta, ocorre um deslocamento de leucócitos, geralmente neutrófilos, ao longo do endotélio vascular – fenômeno conhecido como marginação leucocitária (DEKKER e SEGAL, 2000).

A fase subsequente está relacionada à quimiotaxia (infiltração de células fagocitárias e leucócitos) e fagocitose tendo como intuito englobar e destruir o agente agressor. A migração leucocitária ocorre através de uma seqüência de reações direcionadas pela ativação de proteínas (moléculas de adesão) e seus ligantes expressos nas membranas das células endoteliais e dos leucócitos (CONRAN et al., 2003; HEIDE et al., 2002). Os leucócitos circulantes no sangue periférico aproximam-se da parede vascular, ativados por quimiocinas e outros ativadores químicos da inflamação, aderem-se firmemente, mas de forma transitória, ao endotélio e atravessam a parede do vaso. Após a diapedese, continuam a migrar em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia (DEKKER e SEGAL, 2000). Este processo é fisiologicamente normal e somente após estímulos é que esses leucócitos aderem firmemente ao endotélio para passarem do vaso sanguíneo para os tecidos (TEDGUI e MALLAT, 2001; SPRINGER, 1994; DRANSFIELD et al., 1992).

Já a última fase é uma complexa série de eventos que visa a regeneração tecidual e a fibrose com reconstituição do tecido lesado (SUZUKI et al., 2003)

Devido à alta capacidade da resposta inflamatória e imunológica causar dano tecidual, é muito importante que o organismo disponha de um controle extremamente rígido para minimizar esses efeitos. Após o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda é de se esperar que o patógeno ou estímulo seja eliminado e que essa resposta entre em declínio de forma que a resposta

inflamatória diminua à medida que o agente irritante é destruído, decaindo também os mediadores inflamatórios e os fenômenos vasculares e exsudativos. Além disso, existem sistemas enzimáticos que exercem papel relevante no combate à inflamação, mas que tendem a minimizar sua atuação finalizando a resposta inflamatória, como o sistema complemento, o sistema da coagulação e o sistema fibrinolítico (plasmina). No entanto, se o estímulo persistir, provavelmente ocorrerá evolução para inflamação crônica (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005; ROITT, BROSTOFF e MALE, 2003).

Inúmeras células auxiliam na defesa do organismo, com destaque para as células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos), polimorfonucleares (neutrófilos, mastócito e eosinófilos) e células endoteliais. Estas, auxiliam na regulação do tônus vascular, no reparo e crescimento tecidual além de desempenharem controle entre a adesão e a migração de leucócitos mediante a expressão de moléculas de adesão (KIM et al., 2009; LARSEN et al., 2003).

Dentre os vários mediadores químicos do processo inflamatório podem citar os autacóides os quais são substâncias formadas pelo organismo que atuam tanto nas próprias células de origem quanto em células vizinhas. Eles englobam inúmeras substâncias, tais como histamina, cininas, eicosanóides, citocinas, fator ativador de plaquetas e óxido nítrico (CLAUDINO, 2006; BARNES, CHUNG e PAGE, 1998).

Os eicosanóides são de origem lipídica, sintetizados a partir dos ácidos graxos ômega-6, como o ácido araquidônico (AA), ou dos ácidos graxos ômega-3, como os ácidos eicosapentanoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). Frente a um estímulo antigênico, químico, traumático, mitogênico ou inflamatório, esses ácidos são mobilizados da membrana das células do sistema imunológico pela ação da enzima fosfolipase A2 (CLAUDINO, 2006).

As citocinas são mediadores liberados por neutrófilos, linfócitos, macrófagos e outros. Dependendo do estímulo, tais mediadores podem ter ação pró ou antiinflamatória. Atualmente o número de citocinas conhecidas é bem amplo e incluem desde as interleucinas e interferons, até os fatores estimuladores de colônias e de necrose tumoral (MANDERSCHIED et al., 2004).

As cininas podem participar da regulação de sistemas fisiológicos, mas suas ações mais conhecidas ocorrem no âmbito patológico, como choque, asma e dor. Podem evocar os sinais cardinais da inflamação (dor, edema, rubor e calor) e estão próximas do topo da cascata de mediadores envolvidos no processo inflamatório (STEWART, 1994).

O Fator ativador das plaquetas (PAF) é formado por diferentes células a partir de um fosfolípido encontrado nas membranas celulares de mastócitos, basófilos, neutrófilos, monócitos, plaquetas e eosinófilos. Sua produção, normalmente ocorre após estímulos alérgicos ou inflamatórios e sua ação é ampla envolvendo os sistemas cardiovascular, respiratório,

gastrointestinal, renal e reprodutivo. Está freqüentemente associado à formação de ácido araquidônico e seus precursores (SIQUEIRA JUNIOR et al., 2000).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, relacionado com inúmeras funções fisiológicas, tais como, transmissão neuronal, relaxamento vascular, imunomodulação e citotoxicidade (TSUCHIYA et al., 2007; BECKMAN e KOPPENOL, 1996). É um potente vasodilatador e seu envolvimento na resposta inflamatória pode ter relação com sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de mudanças no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (SALVEMINI et al. 1996). Seus metabólitos têm a capacidade de lesar o DNA e os lipídeos tanto do agente agressor como das células vizinhas saudáveis, o que é comum nas doenças auto-imunes (HULE; PADMAJA, 1993; CUZZOCREA et al., 2000; MABLEY et al. 2003).

A histamina é encontrada em quantidades irregulares estando armazenada, principalmente, nos tecidos (mastócitos) e no sangue (basófilos). Sua liberação é decorrente de inúmeros fatores, como lesão física, extremos de temperatura, fragmentos do complemento, citocinas e outros. É considerada o principal mediador da fase inicial da inflamação causando um subsequente aumento na permeabilidade vascular - fenômeno considerado essencial para a migração das células de defesa rumo ao local inflamado (GOODMAN e GILMAN, 2003; TROWBRIDGE e EMLING, 1996).

Existem vários métodos experimentais utilizando animais de diferentes espécies para detecção de novos princípios ativos com atividade antiinflamatória. Essa ampla diversidade de modelos ocorre porque, apesar das reações inflamatórias apresentarem características semelhantes, sua etiologia e manifestações clínicas diferem amplamente. Desta forma, métodos que induzem a inflamação aguda são realizados no sentido de abordar a participação de mediadores químicos, tipos celulares e também possibilitam a identificação de drogas com possíveis efeitos antiinflamatórios (SILVA, 2004). Dentre os métodos que avaliam a resposta inflamatória e a atividade antiinflamatória pode-se citar o edema de pata, a quimiotaxia *in vitro* e *in vivo* (BONTA, BRAY e PARNHAM, 1985).

O edema de pata é o teste mais utilizado para avaliar a atividade de agentes antiinflamatórios que exercem efeito na fase aguda da inflamação. Avalia a capacidade de a substância reduzir o edema local induzido por agente flogístico, como a carragenina (MYTHILYPRIYA, SHANTHI e SACHDANANDAM, 2008; CAMARGO, 2006). É realizado utilizando um pletismógrafo que avalia o volume da pata do animal através do deslocamento da solução de cloreto de sódio de forma que a pata edemaciada desloca um volume maior desta solução em relação à não edemaciada. A mensuração é feita subtraindo o volume de líquido deslocado pela pata inflamada pelo volume de líquido deslocado pela pata normal (SILVA, 2006).

Através de estudos sobre a locomoção das células frente à resposta inflamatória observou-se que neutrófilos, eosinófilos, basófilos e fagócitos mononucleares exibem migração direcionada dependendo do agente quimiotático atuante.

Existem diferentes modelos para avaliar a migração celular *in vitro*, sendo que o ensaio mais empregado utiliza filtros de polycarbonato isentos de polivinilpirrolidona, com poros de 5 µm de diâmetro e 12 µm de espessura para separar os compartimentos superiores e inferiores (COLOWICK e KAPLAN, 1999). Os leucócitos se encontram em suspensão (porção superior) frente a um agente quimiotático (porção inferior) e, através do espaço percorrido pelo leucócito no filtro de polycarbonato (entre as porções), a capacidade migratória dos mesmos é determinada (SANTOS JUNIOR, 2003; PRESIBELLA, SANTOS e WEFORT-SANTOS, 2003).

A avaliação da migração celular *in vivo* pode utilizar ensaios de microcirculação feita com microscópio óptico para visualizar pequenos vasos sanguíneos em tecidos inflamados. Isto porque o endotélio é um tecido regulador que controla o tônus vascular, a adesão de células inflamatórias, a homeostase e a trombose na parede dos vasos. Ele produz substâncias vasoativas em resposta a fatores ambientais e serve como um importante órgão autócrino e parácrino que regula a contratilidade e a composição das células da parede vascular (JANSSENS et al., 1998).

OBJETIVO

- Apresentar alguns modelos experimentais de resposta inflamatória que podem ser utilizados na investigação da atividade antiinflamatória de drogas ou de produtos naturais.

METODOLOGIA

I) EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (WINDER et al., 1957)

- Deixar os animais em jejum de aproximadamente 15 horas.
- Identificar e pesar os ratos.
- Determinar o volume inicial da pata com auxílio de um pletismógrafo (3 leituras por pata e calcular a média).
- Realizar tratamento com a substância teste (via oral)
- Após 1 hora, injetar 25 µl de carragenina (solução 100 µg) por via subcutânea em uma das patas posteriores do animal (sugerimos a pata esquerda).
- Após 1, 3 e 5 horas medir o desenvolvimento do edema.
- Cálculo do edema: Volume final da pata – volume inicial da pata.

II) QUIMIOTAXIA IN VITRO (DAL-SECCO et al., 2008)

- Para avaliar a quimiotaxia *in vitro*, leucócitos serão isolados da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com a injeção i.p. de 1 mg/200µL de Zymosan.
- Após 4 horas, os animais serão anestesiados e sacrificados, a cavidade peritoneal será lavada com 3 mL de PBS/EDTA.
- O número de leucócitos totais no fluído peritoneal será determinado em câmara de Neubauer, após a diluição com líquido de Turk (10: 90) e sua viabilidade será determinada.
- O lavado peritoneal coletado será centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada (4°C) e, após, as células serão ressuspensas em meio RPMI/BSA 0.01%.
- O número de células será ajustado para 1×10^6 /mL em RPMI/BSA 0,01%, e será adicionada a substância a ser testada. Deixar 30 minutos em estufa a 37°C e 5% CO₂.
- A quimiotaxia será efetuada em microcâmara de 48 poços (Neuro Probe), separados por membrana de polycarbonato com poros de 5 µm de diâmetro. Na câmara inferior, será colocado 26 µL do meio de cultura RPMI-BSA 0,01% (controle) ou de um dos estímulos quimiotáticos: fMLP, LTB₄ ou outro diluídos em RPMI-BSA.
- Uma solução (50 µL) de células ($1,0 \times 10^6$ células/mL) será colocada na câmara superior.
- A câmara será incubada por 60 minutos em estufa a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, a membrana de polycarbonato será removida, fixada e corada.
- A contagem de leucócitos será realizada por meio de microscopia óptica comum onde serão avaliados cinco campos (1000X) em cada poço.
- Os resultados serão expressos como o número de leucócitos por campo. Os dados serão apresentados como média ± erro padrão da média (epm).

III) QUIMIOTAXIA IN VIVO (FORTES et al., 1991, modificada)

- Pesar os animais (ratos Wistar, machos, pesando entre 220g e 240 g);
- Preparar a droga ou substância a ser testada, a carragenina 1mg/ml e a solução anestésica (hidrato de cloral 750mg/kg - 25%);
- Tratar o animal com a droga ou substância a ser testada 30 minutos antes da injeção da carragenina;
- Injetar 0,1ml (dose 100µg) da solução de carragenina no escroto esquerdo por via subcutânea;

- Trinta minutos após a injeção de carragenina, injetar o hidrato de cloral 25% (750mg/kg), por via subcutânea, no dorso do animal;
- Depilar o escroto do animal 15 minutos antes da cirurgia;
- Uma hora após, realizar a cirurgia para exposição da fáscia espermática.
- Fixar a preparação sobre a placa aquecida no microscópio;
- Lavar e cobrir a preparação com solução de Ringer;
- Localizar uma vênula de 15 a 18 μ m (1,95 – 2,30 cm em tela cheia);
- Realizar 2 contagens de *rolling* e adesão por 10 minutos;
- Realizar a média entre as duas contagens para cada animal.

REFERÊNCIAS

- BABU, N. P.; PANDIKUMAR, P.; IGNACIMUTHU, S. 2009. Anti-inflammatory activity of *Albizia lebbek* Benth., an ethnomedicinal plant, in acute and chronic animal models of inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 5, 54491-54495.
- BARBOSA, J.M., Piuveza, M.R., MOURA, M.D., SILVA, M.S., LIMA, K.V.B., LEITÃO da CUNHA, E.V., FECHINE, I.M., TAKEMURA, O.S., 2006. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16, 109-113.
- BARNES, P.J.; CHUNG, K.F.; PAGE, C.P. 1998. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Reviews*. 50, 515-596.
- BECKMAN, J. S., KOPPENOL, W. H. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal Physiology*. 271:5, 1424-1437.
- BONTA, I.L.; BRAY, M.A.; PARNHAM, M.J. (eds). 1985. *Handbook of inflammation*. New York: Elsevier. 5, 27-47.
- CAMARGO, L. C. S. 2006. Efeito antiinflamatório do extrato de *Zingiber officinale*: Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.
- CLAUDINO, R. F. 2006. Caracterização farmacológica e molecular dos mecanismos envolvidos no edema de pata induzido pela prostaglandina E2 em camundongos. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina.
- CONRAN, N.; GAMBERO, A.; FERREIRA, H.H.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. 2003. Nitric oxide has a role in regulating VLA-4-integrin expression on the human neutrophil cell surface. *Biochemical Pharmacology*. 66, 43-50.
- CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L.; DE SARRO, A.; Van De LOO, F. A. J.; CAPUTI, A. P. 2000. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 162, 1859-1866.

DAL-SECCO, D., CUNHA, T.M., FREITAS, A., ALVES-FILHO, J.C., SOUTO, F.O., FUKADA, S.Y., GRESPAN, R., ALENCAR, N.M., NETO, A.F., ROSSI, M.A., FERREIRA, S.H., HOTHERSALL, J.S., CUNHA, F.Q., 2008. Hydrogen sulfide augments neutrophil migration through enhancement of adhesion molecule expression and prevention of CXCR2 internalization: role of ATP-sensitive potassium channels. *Journal of Immunology*. 15, 4287-4298.

DEKKER, L. V.; SEGAL, A. W. 2000. Perspectives: signal transduction. Signals to move cells. *Science*, 287:5455, 982-985.

DRANSFIELD, I.; BUCKLE, A.M.; HOGG, N. 1992. Interaction of leukocyte integrins with ligand is necessary but not sufficient for function. *Journal of Cell Biology*. 116, 1527- 1535.

DUNG, N.T.; BAJPAJ, V.K.; YOON, J.I.; KANG, S.C. 2009. Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) *Food and Chemical Toxicology*. 47, 449–453.

FORTES, Z.B.; NIGRO, D.; SCIVOLETTO, R.; CARVALHO, M.H. 1991. Influence of sex on the reactivity to endothelin-1 and noradrenaline in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 13:5, 807-16.

HEIDE, D.; RAAB, M.; MARKOVIC, S.; KARIMI, A.; GRIESMACHER, A.; MUELLER, M., 2002. Endothelial adhesion molecule expression in an in vitro model of inflammation international. *Journal of Clinical Chemistry*. 325, 171.

HULE, R.E.; PADMAJA, S. 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Research Communications*. 18, 195-199.

JANSSENS S.; FLAHERTY D.; NONG Z.; VARENNE O.; VAN PELT N.; HAUSERMANS C.; ZOLDHELYI P.; GERARD R.; COLLEN D. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation*. 7;97: 1274-1281, 1998.

KIM, Y.H.; KIM, D.H.; LIM, H.; BAEK, D.Y.; SHIN, H.K.; KIM, J.K. 2009. The Anti-inflammatory Effects of Methylsulfonylmethane on Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Murine Macrophages. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 32:4, 651-656.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LARSEN, E.; KHARAZMI, A.; CHRISTENSEN, L.P., CHRISTENSEN, S.B. 2003. Antiinflammatory Galactolipid from Rose Hip (*Rosa canina*) that Inhibits Chemotaxis of Human Peripheral Blood Neutrophils in Vitro. *Journal of Natural Products*. 66:7, 994–995.

MABLEY, J.; SORIANO, F.; PACHER, P.; HASKÓ, G.; MARTON, A.; WALLACE, R.; SALZMAN, A.; SZABÓ, C. 2003. The adenosine A3 receptor agonist, N6-(3-iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methyluronamide, is protective in two murine models of colitis. *European Journal of Pharmacology*. 466, 323-329.

MANDERSCHIED, P.A.; BODKIN, R.P.; DAVIDSON, B.A.; JENSEN, E.; RUSSO, T.A.; KNIGHT, P.R. 2004. Bacterial clearance and cytokine profiles in a murine model of postsurgical nosocomial pneumonia. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 11, 742-751.

MYTHILYPRIYA, R.; SHANTHI, P.; SACHDANANDAM, P. 2008. Synergistic Effect of Kalpaamruthaa on Antiarthritic and Antiinflammatory Properties—Its Mechanism of Action. *Inflammation*. 31:6, 391-398.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. 2002. *Nature*, 420, 846-852.

PRESIBELLA, M. M.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. 2003. Influência de extratos hidroetanólicos de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 13:2, 75-82.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. 6 ed. Barueri. 2003.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G. 1996. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology*. 118, 829-838.

SANTOS JUNIOR, J. 2003. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. *Revista brasileira de coloproctologia*. 23:3, 206-210.

SIQUEIRA Jr, J. F.; DANTAS, C. J. S. 2000. Mecanismos Celulares e Moleculares da inflamação. Rio de Janeiro: MEDSI, 83-103.

SILVA, M. B. S. da. Efeito antiinflamatório dos ligantes do receptor benzodiazepínico periférico (pk 11195 e ro5-4864) no modelo de pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos. Dissertação (Mestrado): Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, fev. 2004.

SILVA, I. E. F. da. Obtenção e avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória de extratos hidroalcoólicos de casca, folhas e flores de *Tabebuia impetiginosa* (MART. ex DC) – IPÊ ROXO. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) - Universidade de Franca. 2006.

SOUZA, W. M. da. Estudo químico e das atividades biológicas dos alcalóides indólicos de *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, APOCYNACEAE – (Agoniada) – Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, 2008.

SPRINGER, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*. 76, 301-314.

STEWART, J. M. 1994. The present and the future of bradykinin antagonists. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 27, 1699-1706.

SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. 2003. Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 35, 881–900.

TAMURA, E.K.; JIMENEZ, R.S.; WAISMAM, K.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P.; MALPEZZI-MARINHO, E.A.; MARINHO, E.A.; FARSKY, S.H. 2009. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*. 122, 478–485.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. 2001. Anti- inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circulation Research*. 8:9, 877-887.

TRACEY. 2002. The inflammatory reflex. *Nature*. 420: 6917, 853-859.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. 1996. *Inflamação. Uma revisão do processo*. 4.ed. São Paulo: Quintessence. 172.

TSUCHIYA, K.; SAKAI, H.; SUZUKI N.; IWASHIMA, F.; YOSHIMOTO, T.; SHICHIRI, M.; HIRATA, Y. 2007. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high-fat-induced obese mice. *Endocrinology*. 148:10, 4548-4556.

WEBSTER, N.R.; GALLEY, H.F. 2003. Inflammation and immunity. *British Journal of Anaesthesia*. 3:2, 54-58.

WINDER CV.; MAX J.; BEEN MA. 1957. Rapid foot volume measurements on unanesthetized rats and the question of a phenyl-butazone effect on anaphyloctoid edema. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*. 112, 174-187,

YOON, D.Y.; CHO, M.C.; KIM, J.H.; KIM, E.J.; KANG, J.W.; SEO, E.H.; SHIM, J.H.; KIM, S.H.; LEE, H.G.; OH, G.T.; HONG, J.T.; PARK, J.W.; KIM, J.W. 2008. Effects of a Tetramethoxyhydroxyflavone on the Expression of Inflammatory Mediators in LPS-Treated Human Synovial Fibroblast and Macrophage Cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18:4, 686–694.

YOSHIKAI, Y. 2001. Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 14:3, 257-263.