

DNA BARCODES COMO FERRAMENTA PARA ANÁLISE DE VARIABILIDADE GENÔMICA

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Fernandez

Dr^a. Roxelle Ethienne Ferreira Munhoz

Dr^a. Thaís Souto Bignotto

INTRODUÇÃO

A **Taxonomia**, ciência de classificação dos seres vivos, estabelece critérios para classificar todos os animais e plantas em grupos de acordo com suas características fisiológicas, evolutivas, anatômicas e ecológicas. Carl Linnaeus formalizou a classificação biológica com seu sistema de nomenclatura binomial que designa cada organismo a um nome de **gênero** e **espécie**. A taxonomia de Linnaeus é considerada um **sistema natural de classificação** para organismos vivos uma vez que todos os seres vivos são descendentes de um único ancestral comum e foram se diferenciando um do outro por meio de uma série de eventos de especiação, num processo conhecido por evolução. Conseqüentemente, alguns grupos de espécies são mais relacionados do que outros e podem ser classificados dentro do mesmo gênero, família, ordem, etc. O estudo das relações evolutivas (ou seja, relações filogenéticas) de um grupo de organismos é denominado **filogenia**.

Estima-se que a biodiversidade total da Terra seja de 10 milhões de espécies. Desde o início da taxonomia, entretanto, apenas cerca de 15% da diversidade de espécies de animais e vegetais foram descritas (Figura 1), constatação que ficou conhecida como **impedimento taxonômico** (Solé-Cava, 2008). A identificação de espécies por meio desta abordagem, para ser empregada como rotina, apresenta algumas limitações significativas:

1. Tanto a plasticidade fenotípica quanto a variabilidade genética nos caracteres empregados para o reconhecimento de espécies podem levar a uma identificação incorreta da espécie,
2. Omissão de taxa crípticos morfologicamente, os quais são comuns em vários grupos,
3. Chaves morfológicas freqüentemente são eficientes somente para um estágio do ciclo de vida e assim muitos indivíduos não podem ser identificados,
4. O uso de chaves de identificação muitas vezes demanda a necessidade de recorrer a especialistas para não comprometer a identificação e

5. Falta de estímulos ao trabalho dos taxonomistas.

A limitação herdada no sistema de identificação baseada na morfologia e a escassez de taxonomistas especializados resultaram na baixa taxa de identificação de espécies animais e vegetais até o momento. Dessa maneira, o ritmo de descoberta e descrição de espécies é lento diante da velocidade da taxa de extinção. Portanto, é provável que muitas desapareçam sem terem sido conhecidas.

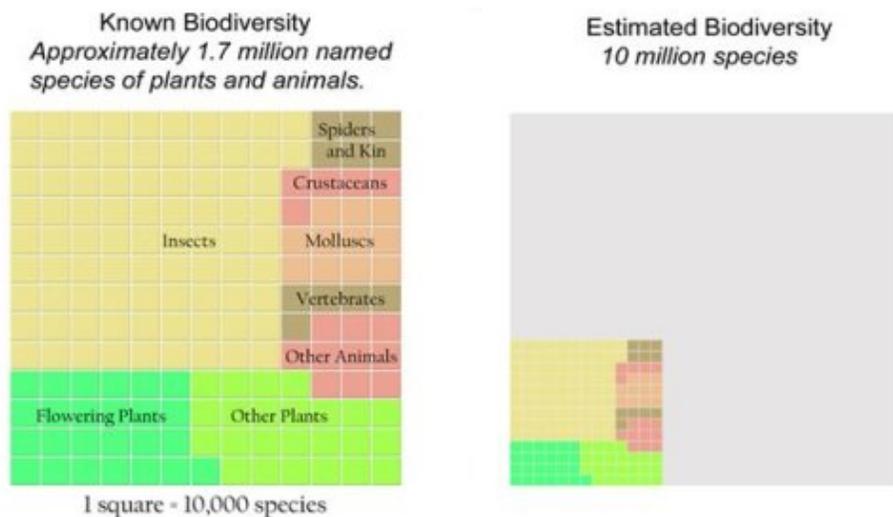


Figura 1. Biodiversidade conhecida e estimada.

A fim de tentar resolver o problema do impedimento taxonômico, Hebert et al., em 2003, propuseram o programa *Consortium for the Barcodes of Life (CBoL)*, que pretende padronizar e automatizar a identificação e descrição de toda biodiversidade apenas com uma sequência de DNA, utilizada de forma semelhante aos códigos de barras, sendo por isso denominada de **DNA barcode**. Para identificar correta e rapidamente as espécies de animais, foram selecionados cerca de 700 pares de bases (pb) do gene mitocondrial **citocromo c oxidase I, COI**, cuja sequência completa tem aproximadamente 1.545 pb (Figura 2). Para plantas, os marcadores do cloroplasto, *rbcl* (*rubisco large subunit*) e *matK*, têm sido delimitados como região padrão para código de barras.

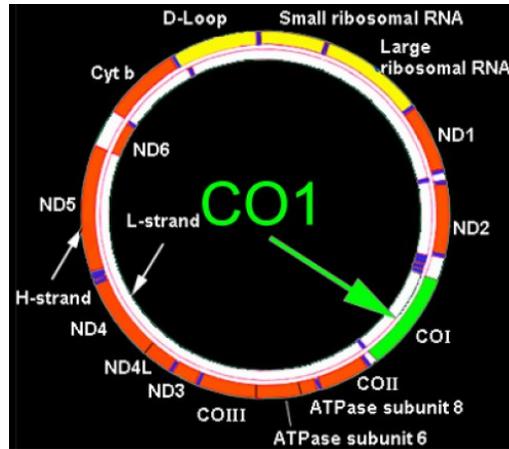


Figura 2. DNA mitocondrial, evidenciando a região do gene citocromo c oxidase I, COI.

DNA barcode

O DNA *barcode* é uma sequência curta de DNA, facilmente identificada, e característica de cada espécie. A região do gene que está sendo usada por quase todos os grupos de animais é de 648 pb do **gene mitocondrial citocromo c oxidase I, COI** (Figura 2), e está se mostrando altamente eficaz na identificação de aves, insetos, peixes, e outros grupos de animais. A vantagem de usar COI é que a região é curta o suficiente para ser sequenciada de forma rápida e barata e ainda longa o suficiente para identificar variações entre as espécies.

De acordo com o *International Barcode of Life Project, iBOL* (<http://ibol.org/about-us/what-is-dna-barcoding/>), DNA *barcodes* foi criado para chamar a atenção da comunidade científica, quando em 2003 o grupo de pesquisa de Paul Hebert da Universidade de Guelph publicou o artigo científico **“Biological identifications through DNA barcodes”**. Neste artigo, eles propuseram um novo sistema de identificação e descobrimento de espécies utilizando um pequeno trecho de DNA de uma região padronizada do genoma. Essa sequência de DNA pode ser usada para identificar diferentes espécies, da mesma maneira que um scanner de supermercado usa as listras pretas do código de barras UPC (*Universal Product Code*) para identificar suas compras (Figura 3). O código de barras emprega 10 números alternados em 11 posições para gerar 100 bilhões de identificadores únicos. No caso do DNA *barcodes*, pode haver até quatro possibilidades de nucleotídeos (adenina, timina, citosina e guanina) em cada posição, mas com uma cadeia de sítios muito mais longa que 11

posições. Por exemplo, a combinação de apenas 15 dessas posições criaria um bilhão de códigos únicos, um número muito maior do que o de espécies conhecidas (Hebert et al., 2003).

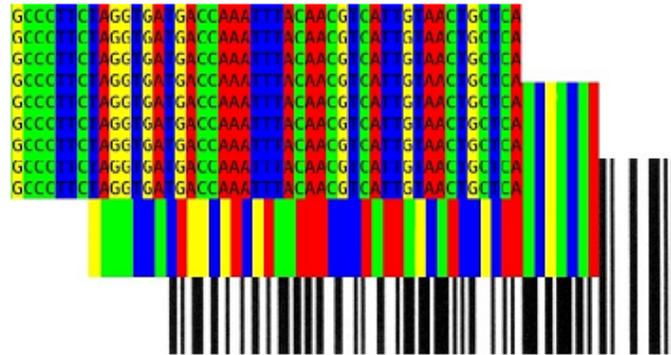


Figura 3. Analogia entre o DNA *barcodes* e o código de barras convencional.

Para armazenar essa enorme quantidade de sequências do DNA *barcodes* para todas as espécies existentes, foi criado o **BOLD, *The DNA Barcode of Life Data System*** (<http://www.boldsystems.org/>). Nesse banco de dados, estão incluídas outras informações além da sequência do DNA *barcodes*, como: fotos do espécime (*voucher*), local de coleta, dados taxonômicos e informações moleculares (eletroferogramas e *primers* utilizados).

A identificação das espécies, no BOLD, é realizada por meio de comparações de uma sequência de interesse com sequências previamente depositadas no banco. Essa comparação é feita por métodos de distância genética, segundo o modelo padrão de substituição molecular **Kimura-2-parâmetros, K2P** (Kimura, 1980), sugerido por Hebert et al. (2003), uma vez que essa medida de distância é a mais eficaz quando distâncias genéticas são baixas. Em seguida, uma árvore ***neighbor-joining* (NJ)** é construída com as 100 sequências mais similares à sequência de interesse. O procedimento NJ foi considerado como método padrão de inferências filogenéticas nos estudos de DNA *barcodes* (Hebert et al., 2003) devido sua alta eficiência e rapidez em análises de espécies em larga escala (Kumar e Gadagkar, 2000). Finalmente, a espécie é atribuída àquela cuja sequência *barcodes* se mostrou mais similar. De acordo com dados publicados, a identificação de espécies de insetos, aves e mamíferos apenas pode ser aceita se houver similaridade com alguma sequência armazenada no BOLD maior do que 97%, 98% e 98%, respectivamente. Em outras palavras, caso a diferença seja maior

que 3% ou 2%, não é possível identificar a amostra e seria necessário realizar análises mais detalhadas (Rubinoff, 2006).

Um critério adotado pelo BOLD para a delimitação de espécies se baseia em **valores limites para as divergências nucleotídicas intra e interespecíficas**. Um dos limites é de **3%** (valor estabelecido para insetos), em que valores de divergência intra-específica abaixo deste limite determinam uma única espécie e valores de divergência interespecíficas acima, apontam para diferentes espécies. O outro limite, que surge como uma atualização do primeiro, sugere que a média da divergência nucleotídica entre espécies pertencentes ao mesmo gênero deve ser **10 vezes** superior à média da divergência intra-específica encontrada para as mesmas espécies. A observação destes critérios permite, assim, determinar se estamos perante a mesma espécie ou espécies diferentes

Características da região *barcodes*:

- Flanqueada por sequências nucleotídicas semelhantes em todas as espécies,
- Fácil isolamento e seqüenciamento,
- Baixa variabilidade intra-específica (todos os indivíduos de uma espécie apresentam sequências idênticas/ semelhantes de DNA),
- Elevados níveis de variação ENTRE espécies,
- Pequena o suficiente para ser seqüenciada rápida e economicamente.

Aplicações do DNA *barcodes*

- Ferramenta para **identificação de espécies**:
 - vetores de doenças, pestes agrícolas, espécies invasoras (organismos perigoso)
 - indicadores ambientais, espécies protegidas (espécies ameaçadas)
 - usando exemplares pequenos, danificados, conteúdos estomacais, amostras fecais (identificação de espécie derivada de amostras não-reconhecíveis)
- Ferramenta para complementar **estudos filogenéticos**:
 - Identificação taxonômica em nível de espécies
- Ferramenta para **melhorar a taxonomia** em nível específico:

- associação de todos os estágios da história de vida, gêneros (determinação da espécie que deu origem a alguma larva específica; inclusão ou não de espécimes similares morfologicamente em uma mesma espécie; identificação de organismos dimórficos)
- Ferramenta de triagem para sinalizar potenciais **novas espécies**:
 - espécies crípticas
 - espécies ainda não descritas
- Ferramenta para **conservação, biossegurança e biopirataria**:
 - preservação da biodiversidade global
 - identificação de espécies invasoras ou introduzidas
 - detecção de fraudes alimentares

Limitações/ Desvantagens do DNA *barcodes*

Apesar de ser uma abordagem que promete identificar rápida e eficientemente todas as espécies, o DNA *barcodes* apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. A primeira delas baseia-se no fato de ser uma metodologia que utiliza apenas um marcador molecular para classificar e identificar os organismos, deixando de lado a taxonomia tradicional. Alguns pesquisadores alertam para o fato de que o gene COI pode não ser informativo o suficiente para descrever toda a diversidade biológica. Isso ocorre porque o DNA mitocondrial apresenta algumas características que restringem a possibilidade de realizar inferências sobre o limite entre as espécies, como a herança materna, retenção de polimorfismo ancestral (subestimação do número de espécies), heteroplasmia e cópias nucleares do gene COI (superestimação do número de espécies). Em alguns casos, portanto, seria necessário incluir o estudo de um marcador nuclear.

Outra limitação da técnica recai em alguns grupos animais que apresentam baixa diversidade na sequência de DNA, ou seja, mais de uma espécie compartilha a mesma sequência nucleotídica, provavelmente devido a divergência entre as espécies ter ocorrido a relativamente pouco tempo. No entanto, diversos estudos realizados sugeriram que o *barcodes* é capaz de identificar inequivocamente a maioria das espécies animais. Apenas aproximadamente 2-5% das espécies reconhecidas apresentam sequências *barcodes* compartilhadas ou sobrepostas com outras espécies proximalmente relacionadas.

O principal pressuposto para a efetividade do DNA *barcodes* é de que as divergências intra-específicas sempre sejam menores que as interespecíficas, o que se chama de *barcoding gap*. Existem casos, no entanto, em que pode ocorrer sobreposição nos níveis de variação intra e interespecíficos de alguns táxons, o que atrapalha a identificação de um organismo pertencente a esse grupo (Figura 4).

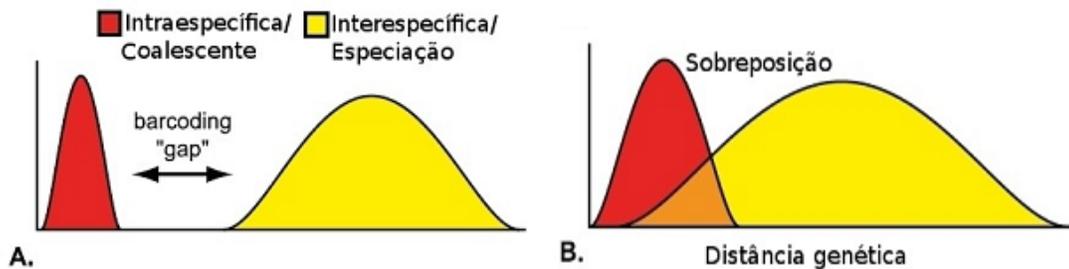


Figura 4. Esquema do *barcoding gap*. A distribuição da variação intra-específica é mostrada em vermelho e da interespecífica, em amarelo. (A) Mundo ideal para DNA *barcodes*, com distribuições discretas e sem sobreposição. (B) Uma versão alternativa com significativa sobreposição, sem *gap*. (Fonte: Meyer e Paulay, 2005).

DNA *barcoding* compreende uma região pequena e altamente variável do genoma mitocondrial, denominada de COI ou citocromo c oxidase I. Com milhares de cópias por célula, essa sequência mitocondrial pode ser rapidamente amplificada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reação em Cadeia da Polimerase) até mesmo de espécimes muito pequenos ou degradados. Primeiramente, uma amostra do tecido animal deve ser coletada, tomando o cuidado para preservar o espécime sempre que possível e anotando a localização geográfica do local de sua coleta. Um inseto inteiro ou uma amostra de músculo são fontes adequadas. Em seguida, o DNA é extraído da amostra de tecido do animal, e a porção *barcodes* do gene COI é amplificada por PCR com *primers* específicos. A sequência amplificada é então seqüenciada em seqüenciador automático em uma ou em ambas as direções. As seqüências resultantes são utilizadas em busca em bancos de dados de DNA. Uma estreita correspondência entre duas seqüências identifica rapidamente uma espécie que já está representada no banco de dados (Figura 5).

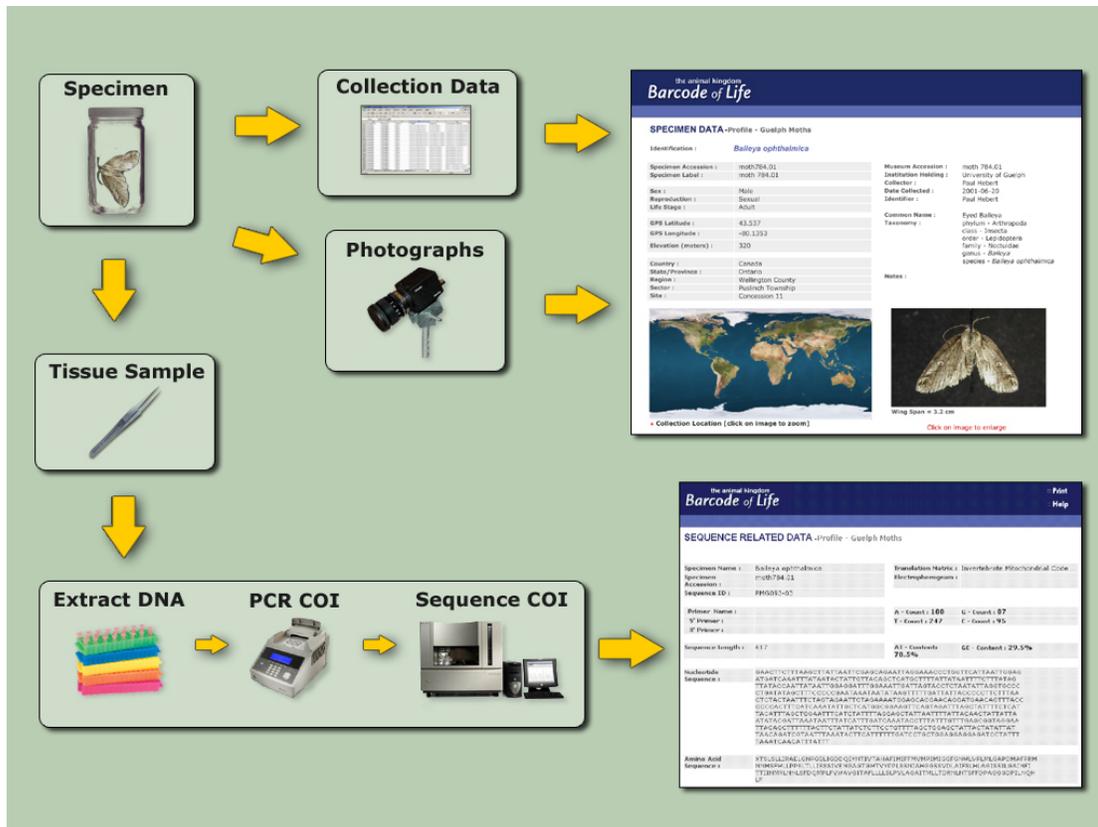


Figura 5. Procedimentos de análise do DNA *barcodes*.

A seguir, serão apresentados os métodos e protocolos utilizados laboratorialmente na obtenção e análise de sequências *barcodes*.

Metodologia experimental

1. Extração de DNA de insetos (*Bombyx mori*)



1. Identificar no tubo a espécie/raça e sua numeração.
2. Macerar a mariposa em nitrogênio líquido (marca de 250 μ L – tubos de 2 mL);
3. Adicionar de 500 μ L a 750 μ L de **tampão de extração**;
4. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
5. Transferir o sobrenadante (~ 750 μ L) para novos tubos;
6. Adicionar ao sobrenadante 750 μ L de **tampão para proteinase K** e 1,5 μ L de **proteinase K**;
7. Incubar as amostras a 37°C por 3 horas ou a 60°C por 1 hora (com agitação);
8. Separar as amostras em dois tubos;
9. Acrescentar a cada tubo 750 μ L de **clorofórmio** (ou o mesmo volume);

10. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
11. Transferir o sobrenadante para novo tubo e adicionar 350 µL de **fenol** e 350µL de **clorofórmio** (1 fenol:1 clorofórmio);
12. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
13. Transferir o sobrenadante para novo tubo (1,5 mL) para precipitação;
14. 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 µL de sobrenadante, usar isopropanol
15. Fechar os tubos presos em um barbante e mergulhá-los em nitrogênio líquido durante 30 segundos;
16. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
17. Descartar o sobrenadante;
18. Lavar o pellet com **etanol** 70% ou 80% (\approx 70 a 100 µL);
19. Colocar os tubos para secar;
20. Ressuspender o pellet em TE 1X + RNase;

Purificação do DNA

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

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

A. Tampão de extração

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

B. Tampão para proteinase K

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

2. Amplificação do DNA genômico por PCR (Reação em cadeia da polimerase)

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.

Objetivo: amplificar a região *barcodes* do gene mitocondrial COI, por meio de PCR.

Material:

- Oligonucleotídeos (*primers*) específicos (5 mM)
- DNA-molde (DNA de *Bombyx mori*) contendo o alvo
- dNTPs (desoxirribonucleotídeos): dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (1 mM)
- Tampão para *Taq* DNA-polimerase (10X)
- *Taq* DNA-polimerase (1 U/μl)
- MgCl₂ (50 mM)

Os iniciadores ou *primers* são oligonucleotídeos complementares a seqüências do DNA. Nesse caso, serão utilizados *primers* descritos por Hebert et al. (2004) que flanqueiam a região padrão do *barcodes* (Figura 1). O segmento de DNA amplificado inclui a seqüência nucleotídica situada entre dois *primers* de aproximadamente 650 pb.

LepF1: 5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3'

LepR1: 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3'

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 (°C) = 4 x (G + C) + 2 x (A + T)

Procedimentos:

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

Quantidades para uma reação:

Água miliQ	8,25 μL
Tampão (10X)*	1,5 μL
dNTPs (1 mM)	0,5 μL
Primer LepF1 (5 mM)	0,5 μL
Primer LepR1 (5 mM)	0,5 μL
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 μL
<i>Taq</i> DNA-polimerase (1 U/μl)	1,5 μL

DNA molde (60 ng/μl)	1,5 μL
Volume final	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 catalisar 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:

Passo	Temperatura	Tempo	
1	94°C	1 min	Temperatura Inicial/Denaturação do DNA
2	94°C	40 seg	Denaturação
3	60°C	40 seg	Temperatura de Anelamento dos <i>primers</i>
4	72°C	1 min	Extensão ou Amplificação do DNA
5	Voltar para o passo 2 - 35 X		
6	72°C	30 min	Extensão Final
7	4°C	indefinidamente	Armazenamento

3. Preparar 5 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% .

3. Eletroforese em gel de agarose

Objetivo: preparar gel de agarose para análise de ácidos nucléicos previamente amplificados por PCR.

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*

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 etídeo (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.

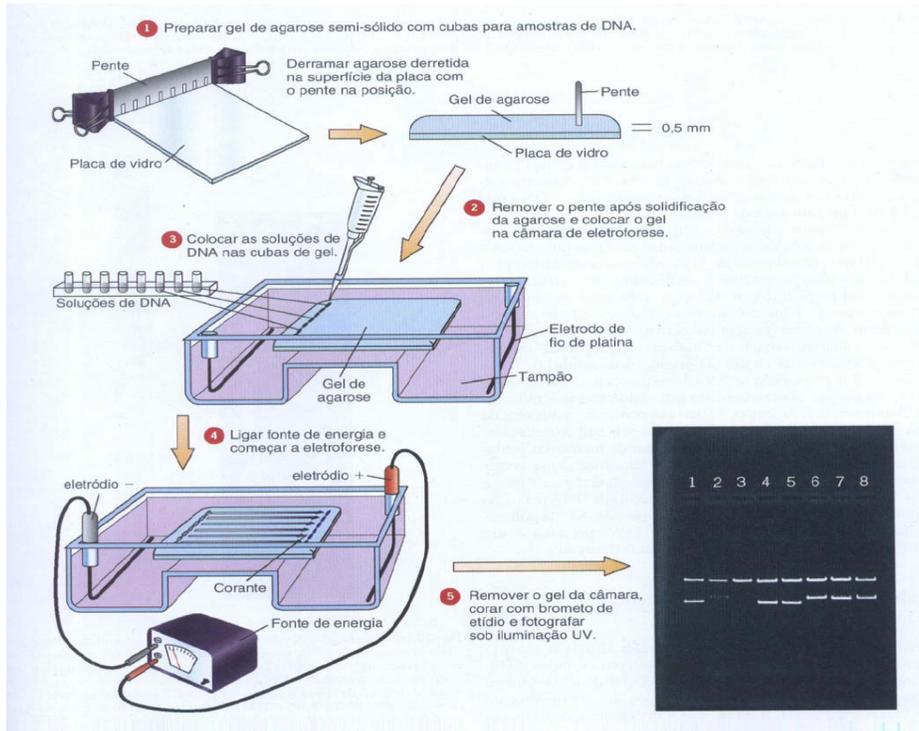
- *Preparação das amostras:*

Em parafilme misturar 5 µl de cada amostra amplificada de DNA mais 3 µl de loading buffer 6X.

- *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 eletroforéticamente 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).



4. Clonagem e transformação

Introdução

A clonagem molecular é o processo de construção de moléculas de DNA recombinantes e da sua propagação em hospedeiros apropriados que possibilitam a seleção do DNA recombinante. A clonagem molecular permite isolar e amplificar uma sequência particular de DNA a partir de uma mistura complexa de fragmentos, porque se formam moléculas de DNA recombinante independentes que replicam numerosas vezes no hospedeiro.

Objetivo: aumentar a quantidade de DNA amplificado por PCR, no caso uma região do gene COI, para posterior sequenciamento.

Materiais:

- Meio LB sólido, 500 mL:

5 g NaCl;
2,5 g Extrato de levedura;
5 g Triptona-bacto;
7,5 g Agar Select.

Diluir em 400mL de água destilada com agitador em um becker. Completar volume para 500mL com água destilada.

• *Meio LB líquido, 250mL:*

2,5 g NaCl;
1,25 g Extrato de levedura;
2,5 g Triptona-bacto.

• *Meio SEC:*

1 mL de meio LB líquido
10 µL de MgCl₂ 1M
10 µL de MgSO₄ 1M
100 µL de glicose 1M

• *Meio LB sólido para placa:*

40 mL de meio LB sólido
400 µL de ampicilina 5 mg/mL
80 µL de X-gal 20 mg/mL
20 µL de IPTG 20 mg/mL

Verter 20 mL em duas placas de Petri autoclavadas.

Procedimentos:

1. Ligação do produto de PCR ao vetor de clonagem pGEM:

* *Kit: pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega.*

5 µL de tampão*
1 µL de ligase*
1 µL de vetor pGEM*
2µL do produto PCR
1µL de água miliQ

2. Transformação por choque térmico

- Descongelar bactérias competentes no gelo por 10 minutos;
- Colocar em um tubo 5µL da ligação em 50µL das bactérias. Misturar 2x com o pipetador;
- Manter no gelo por 30 minutos (nesse tempo fazer o meio SEC)
- Efetuar choque térmico: 2 minutos a 42°C e em seguida 2 minutos no gelo;

- Adicionar 450µL de meio SEC;
- Incubar durante 1 hora a 37°C sob leve agitação (70 rpm) (Nesse tempo derreter o LB sólido e preparar o meio sólido para placa);
- Plaquear em placa de Petri contendo meio sólido e incubar a 37°C durante aproximadamente 16 horas. Colocar 100 µL de cultura em cada placa contendo 20mL de meio sólido;
- Coletar colônias brancas e transferi-las para tubos individuais contendo 5 mL de LB líquido e 50 µL de ampicilina;
- Incubar a 37°C por 70 rpm durante aproximadamente 16 horas.

3. Preparação do DNA plasmidial por STET e CTAB

- Fazer conserva e estocar no freezer -80°C
 - Conserva: 850 µL da cultura + 150 µL de glicerol
- Centrifugar 1,5 mL da cultura por 2 min a 8.000 rpm. Descartar o sobrenadante. Repetir o processo adicionando mais 1,5 mL da cultura no mesmo tubo;
- Ressuspender em 300 µL de STET no vórtex;
- Adicionar 6 µL de lisozima (50 mg/mL) e incubar por 5 min a temperatura ambiente;
- Manter as amostras por 1 ½ min em 100°C;
- Centrifugar 10 min a 14.000 rpm;
- Transferir o sobrenadante para novo tubo;
- Adicionar 4 µL de CTAB 5%. Misturar gentilmente até que a solução fique turva. Obs: deixar o CTAB 5% no banho-maria a 37°C por aproximadamente 10 min para eliminar os cristais;
- Centrifugar 5 min a 14.000 rpm;
- Descartar o sobrenadante e deixar secar
- Ressuspender em 300 µL de NaCl 1,2M no vórtex e aquecer a 37°C por 1 min;
- Precipitar o DNA com 750 µL de etanol absoluto;
- Centrifugar por 10 min a 14.000 rpm e descartar o sobrenadante;
- Lavar com 100 µL de etanol 70% gelado;
- Secar em temperatura ambiente
- Ressuspender em 100 µL de TE com RNase;
- Deixar por no mínimo 1 hora ou no máximo 2 horas;
- Aplicar as amostras em gel de agarose 0,7%.

5. Amplificação do DNA clonado por PCR

Procedimentos:

1. Amplificação por PCR:

Quantidades para uma reação:

Água miliQ	17,65 μ L
Tampão (10X)*	2,5 μ L
dNTPs (1 mM)	0,8 μ L
Primer M13F (10 mM)	0,8 μ L
Primer M13R (10 mM)	0,8 μ L
MgCl ₂ (50 mM)	1,25 μ L
Taq DNA-polimerase (1 U/ μ l)	0,2 μ L
DNA molde (60 ng/ μ l)	1,0 μ L
Volume final	25 μ L

2. Termociclador:

Passo	Temperatura	Tempo
1	94°C	4 min
2	94°C	30 seg
3	55°C	30 seg
4	72°C	1 min
5	Voltar para o passo 2 - 25 X	
6	72°C	10 min
7	4°C	indefinidamente

6. Purificação do produto de PCR por PEG (Polietilenoglicol)

Objetivo: retirar impurezas, como excesso de primers e dNTPs, da reação de PCR para posterior uso em sequenciamento de DNA.

Materiais:• *PEG, 50 mL:*

- 10 g de polietilenoglicol 8.000 (MW=6.000 a 8.000) (20% PEG)
- 7,3 g de NaCl (NaCl 2,5 M)
- Água Milli-Q para 45 mL

Misturar e deixar o PEG entrar na solução. PEG leva 20 min para entrar na solução.

Após os 20 min, complete com água para 50 mL.

Filtrar com filtros 0,2 µm

• *Etanol 80% (Merck)***Procedimentos:**

(Obs: considerando um volume de 25 µL de produto de PCR)

1. Verifique a qualidade do produto de PCR em gel de agarose;
 2. Adicione 25 µL de solução de PEG (PEG 20% NaCl 2,5 M) em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL;
 3. Transfira o produto de PCR para os tubos contendo PEG e misture muito bem com o pipetador;
 4. Incube a 37°C por 15 minutos.
 5. Centrifugue a 12.000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. Coloque os tubos fechados com a alça da tampa voltada para a parte externa do rotor (assim você saberá onde sedimentará o *pellet* já que não será possível vê-lo) ;
 6. Retire o sobrenadante SUAVEMENTE com o auxílio de um micropipetador P200 e descarte-o;
 7. Adicione 40 µL de etanol (Merck) 80% gelado. Centrifugue por 2 minutos a 12.000 rpm;
 8. Retire o sobrenadante SUAVEMENTE com o auxílio de um micropipetador P200 e descarte-o;
 9. Repita os passos 7 e 8.
 10. Deixe evaporar o etanol residual utilizando o banho seco, estufa ou deixe sobre a bancada. Não deve existir nenhum traço (visível ou cheiro) de etanol;
 11. Ressuspense o *pellet* entre 5 e 15 µl* de água Milli-Q. Pipete várias vezes!!!
- *O volume de água dependerá da concentração inicial do PCR;
12. Quantifique o produto purificado em gel de agarose (1-2µl da amostra).

7. Sequenciamento

Introdução

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. Basicamente, dois métodos têm sido utilizados para determinar a seqüência 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 didesoxirribonucleosídeo 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 seqüência 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 poliacrilamida, 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 (Figura 1).

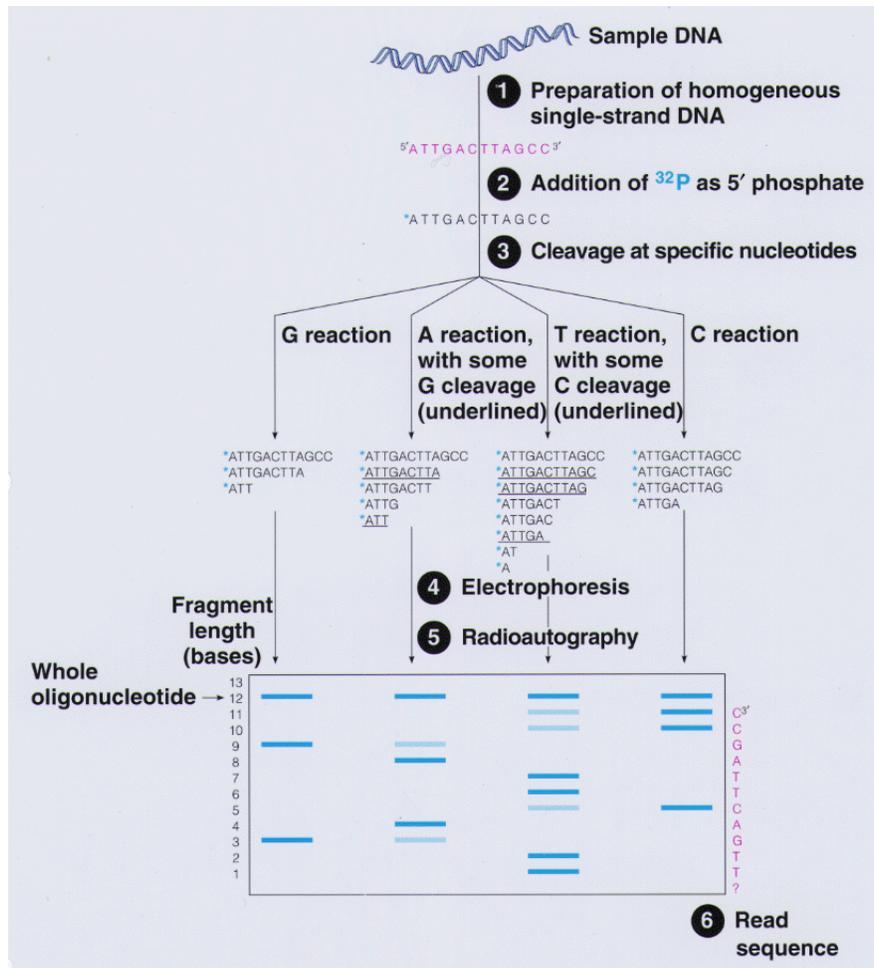


Figura 1. Sequenciamento pelo método de Maxam-Gilbert.

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 auto-radiografia. Lendo a escada produzida pela auto-radiografia dos géis de poliacrilamida, pode-se determinar a seqüência completa de nucleotídeos de uma cadeia de DNA (Figura 2).

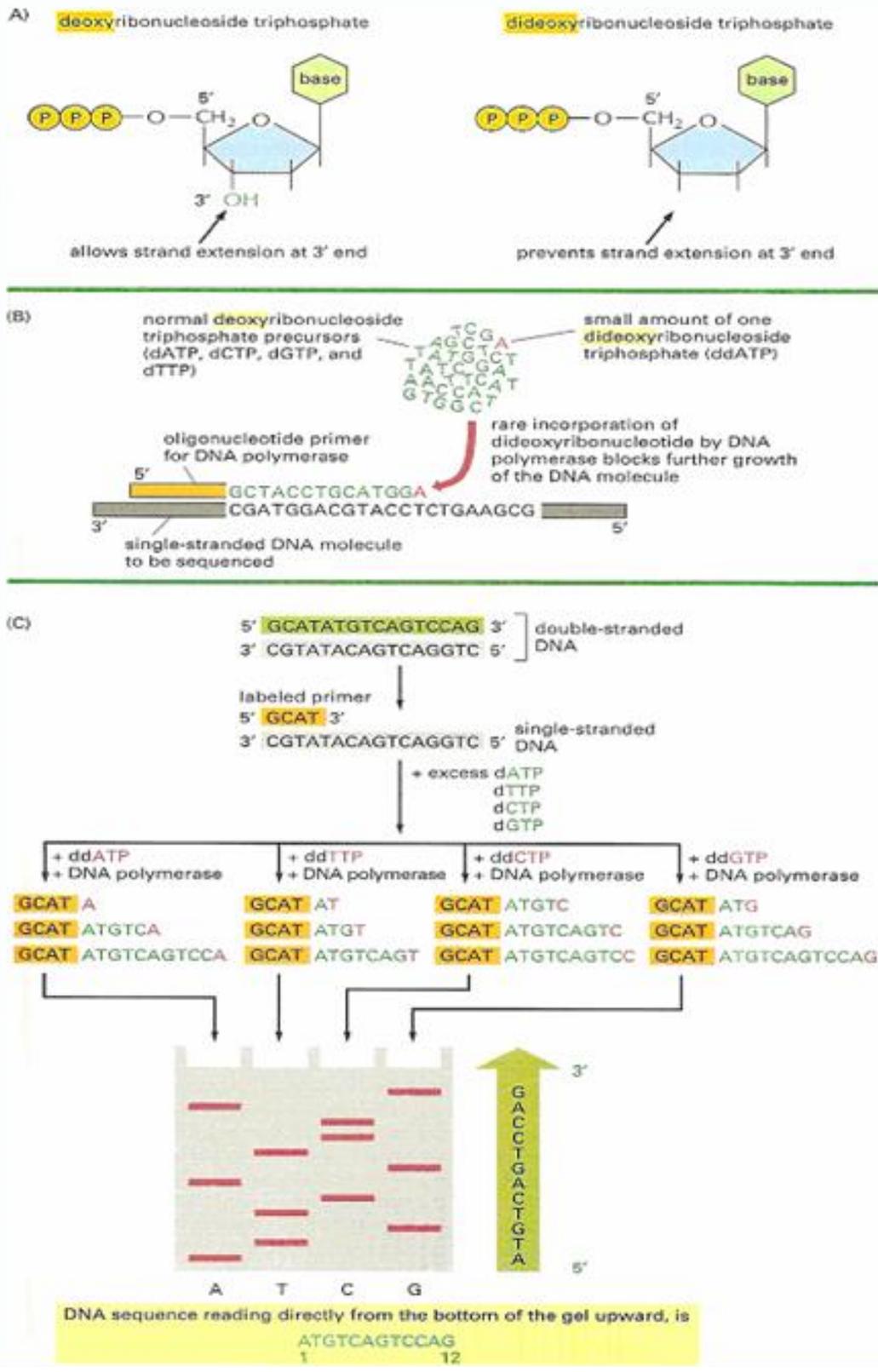


Figura 2. Sequenciamento pelo método de Sanger.

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.

Objetivo: determinar a seqüência de DNA da região *barcode* por meio de seqüenciador automático.

Procedimentos:

1. Preparar reação de seqüenciamento:

4 µL do mix (DYEnamic ET Dye Terminator, MegaBace, GE Healthcare)

1 μL do *primer* M13F ou M13R

5 μL do produto de PCR (DNA) purificado com PEG

2. Colocar os tubos contendo as amostras em termociclador programado para a seguinte ciclagem:

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	30 seg
2	55°C	15 seg
3	60°C	1 min
4	Voltar para o passo 1 – 25 X	
5	4°C	indeterminado

8. Purificação da reação de sequenciamento

Objetivo: purificar as reações de sequenciamento, de modo a ficarem livres de *primers* e dNTPs, para serem lidas em sequenciador automático

Procedimento:

1. Em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) adicionar:

- 10 μL da amostra de DNA amplificada para o sequenciamento,
- 10 μL de água Milli-Q
- 2 μL de acetato de amônio 7,5 M
- 55 μL de etanol 100% (Merck; gelado)

2. Misturar por inversão 15X ;

3. Deixar em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente e no escuro;

4. Centrifugar a 12.000 RPM por 20 minutos a 4°C.

5. Descartar sobrenadante VAGAROSAMENTE em papel;

6. Adicionar 150 μL de etanol 70% (gelado);

7. Centrifugar a 12.000 RPM por 10 minutos a 4°C;

8. Descartar sobrenadante;

9. Repetir os passos 6, 7 e 8;

10. Secar em temperatura ambiente no escuro;
11. Adicionar 10 µL de água Milli-Q;
12. Transferir o DNA para placa de seqüenciamento;
13. Guardar em freezer -20°C até o momento do seqüenciamento.
14. Seqüenciar em seqüenciador automático MegaBace

9. Análise das seqüências nucleotídicas e bioinformática

Introdução

O seqüenciamento nos fornece a seqüência de bases nucleotídicas de uma determinada região do genoma que está sendo estudada. No entanto, para manipular e analisar estas seqüências faz-se necessário o uso de ferramentas da bioinformática.

Procedimentos:

1. BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)

BLAST é provavelmente a ferramenta computacional mais utilizada em biologia molecular e bioinformática. Tem a função de buscar seqüências armazenadas nos bancos de dados pela similaridade entre a estrutura primária da seqüência *query* e as seqüências armazenadas no banco.

É uma ferramenta online, disponibilizada no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Para nucleotídeos, a opção “**nucleotide blast**” (**blastn**) busca uma seqüência nucleotídica no banco de dados com base na seqüência *query*. O programa libera resultados com representação gráfica dos alinhamentos, sumário com uma descrição em uma linha de cada *hit* bem como os alinhamentos com seus respectivos parâmetros calculados.

2. Edição das seqüências nucleotídicas

Nem sempre o seqüenciamento fornece seqüências com 100% de confiança. Para reparar erros advindos do seqüenciamento, recomenda-se fazer a edição dessas seqüências, o que compreende verificar o cromatograma gerado pelo seqüenciador,

buscando por picos duvidosos e com erros (N). O programa **BioEdit** é um editor de seqüências que roda em ambiente Windows e que pode ser utilizado para editar, alinhar e manipular seqüências. Pode ser obtido gratuitamente em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. Devido sua interface gráfica, facilita a edição manual das seqüências.

3. Alinhamento de múltiplas seqüências

O alinhamento de três ou mais seqüências nucleotídicas pode ser realizado por meio do programa **ClustalW**, disponível online em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. É utilizado para identificar regiões conservadas e sítios polimórficos ao longo da seqüência.

4. Análises de distância genética

Quando as seqüências alinhadas são comparadas baseadas em modelos que reflitam sua semelhança, é possível quantificar as diferenças entre elas por meio de valores numéricos. Baseado nesse princípio, a distância genética entre pares de seqüências pode ser estimada a fim de identificar as espécies, utilizando o modelo de evolução de Kimura-2-parâmetros e o algoritmo de *Neighbor-Joining*.

Foi padronizado para estudos de DNA *barcodes* o emprego do modelo de substituição molecular **Kimura-2-parâmetros, K2P** (Kimura, 1980). K2P é o melhor modelo a ser adotado quando as distâncias genéticas dos organismos em estudo são baixas. Nesse modelo é considerada a razão de transições e transversões, levando em conta o desvio na direção das substituições mais comuns, as transições.

5. Construção da árvore filogenética

O procedimento *Neighbor-Joining, NJ*, foi considerado como método padrão de inferências filogenéticas nos estudos de DNA *barcodes* (Hebert et al., 2003) devido sua alta eficiência e rapidez em análises de espécies em larga escala (Kumar e Gadagkar, 2000). A vantagem desse algoritmo é não assumir que a taxa de evolução entre as seqüências que compõem o conjunto de dados seja constante.

Tanto para a obtenção dos valores de distância genética quanto para a construção da árvore filogenética *Neighbor-Joining*, utiliza-se o programa **MEGA** (**Molecular Evolutionary Genetics Analysis**), o qual pode ser obtido em <http://www.megasoftware.net/>.

REFERÊNCIAS

- GONÇALVES, P.F.M. O potencial do *DNA barcode* na identificação de espécies de aves neotropicais. (2009). Dissertação (Pós-graduação em Ciências). Universidade de São Paulo.
- HEBERT P.D., CYWINSKA A., BALL S.L., DEWAARD J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(1512): 313-21.
- HEBERT P.D.N., PENTON E.H., BURNS J.M., JANZEN D.H., HALLWACHS W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(41):14812-7.
- KIMURA, M.A. (1980). Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- KUMAR, S.; GADAGKAR, S.R.. (2000). Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *Journal of Molecular Evolution*, 51: 544-553.
- MEYER, C.P.; PAULAY, G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol.*, 3: e422.
- RATNASINGHAM, S., HEBERT, P.D.N. (2007). Barcoding BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes* 7(3): 355-64.
- RUBINOFF, D. (2006). Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conserv. Biol.*, 4: 1026-1033.
- SOLÉ-CAVA, A. M. (2008). Código de barras de DNA: o rabo que abana o cachorro. *Ciência Hoje*, 41(245): 65-67.
- STOECKLE M. (2003). Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience* 53(9): 2-3.

TÓPICOS EM PROTEÔMICA: EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DE EUKARIOTOS E BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL

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

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 HMGs 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 se ligam com os nucleossomos e provocam uma 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 de ligação ao DNA 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.

ã

A HMGA1 possivelmente direciona o complexo de iniciação da replicação em mamíferos, e a participação das HMGs na estruturação de

sítios iniciadores da replicação ainda é 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 uma citocina mediadora de processos inflamatórios. 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.

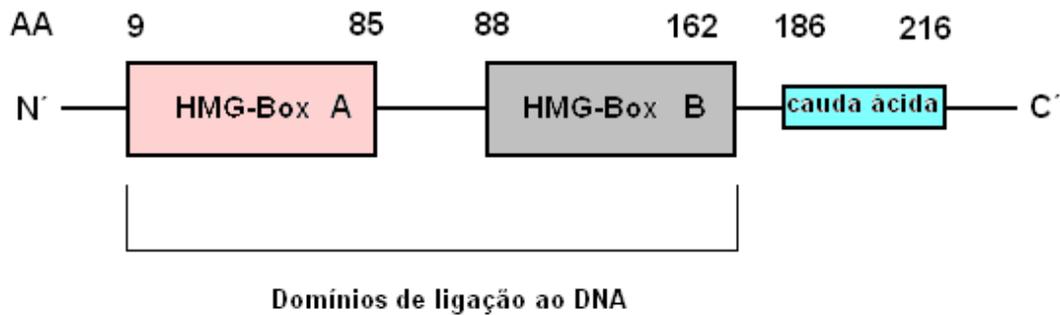


Figura 1. Modelo estrutural da proteína HMGB1. Adaptado de Yang et al. (2005).

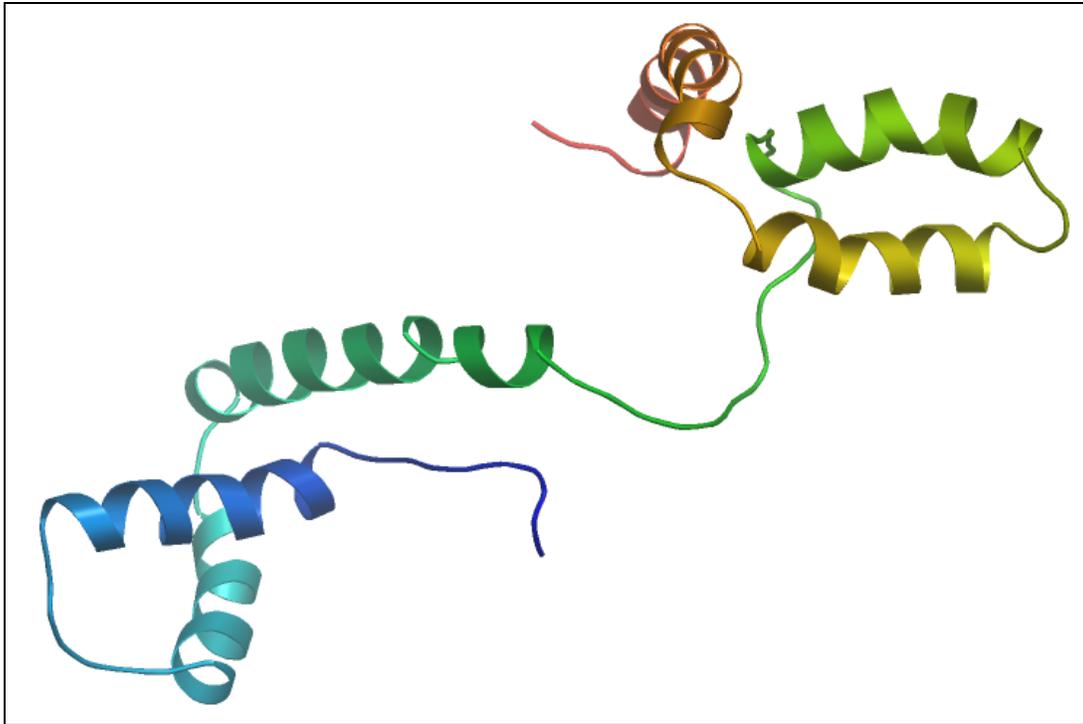


Figura 2. Estrutura geral da proteína HMGB1 de *Mus musculus*. (Kiefer, et al., 2009; Kopp and Schwede, 2004.)

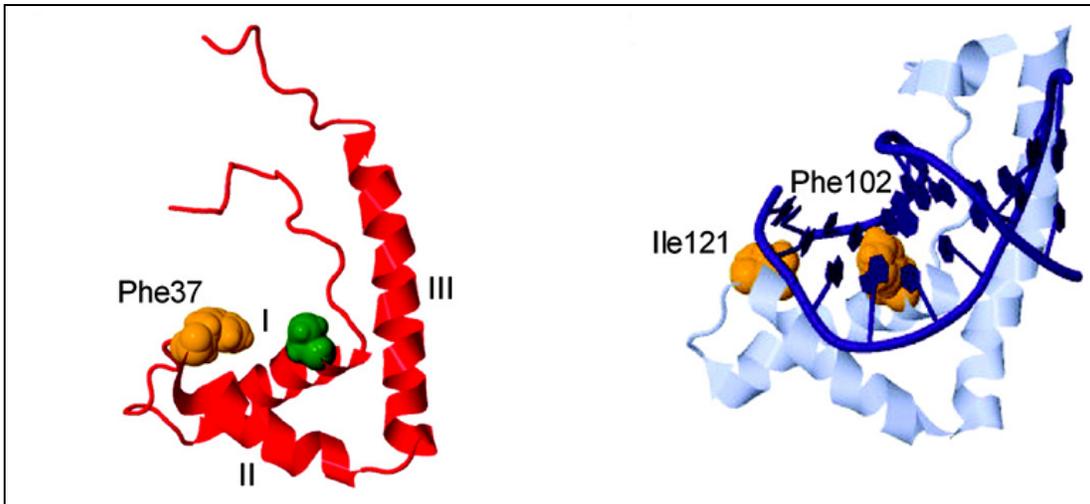
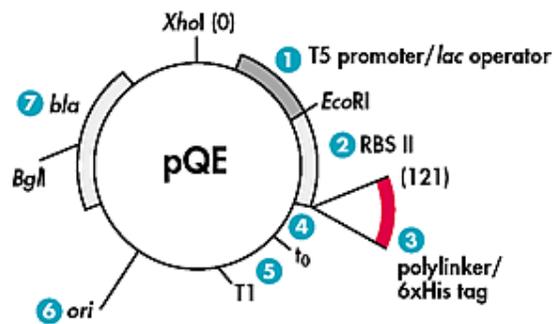


Figura 3. A esquerda estrutura da HMGB1-Box A, mostrando as hélices I-III em vermelho. A direita estrutura da HMGB1-Box B (azul claro) ligada ao DNA (azul escuro).

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	<i>t₀</i> from phage lambda, and T1 from the <i>rmB</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-repressedpgevector.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} ± 0,6
2. Induzir a suspensão com 0.5mM IPTG (500µL IPTG 1M por litro) à 25° C por 5h;
3. Centrifugar 7700g (8000 RPM no rotor Sorvall SL-250T) por 10min, à 4° C;
4. 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 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. Adicionar Lisozima (Cf 1mg/mL) e incubar a mistura 1h a temperatura ambiente (TA) sob leve agitação.

Obs.: alguns protocolos utilizam sonicação para lisar as células antes de passarem pela coluna de afinidade.

3. Adicionar Triton X-100, DNase e RNase a mistura para uma concentração final de 1%, 5µg/mL e 5µg/mL, respectivamente.
4. Incubar a TA por 1h sob leve agitação;
5. Centrifugar 12000RPM por 30 min. à 4°C.
6. Filtrar o sobrenadante clarificado (filtro 5,0µM).
7. Passar a mostra na coluna 1 ou 2 vezes.
8. 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.

9. 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.

10. Correr um gel SDS-PAGE 8% para visualizar quais as frações mais ricas em proteína 10 a 15µL de cada fração;

11. Juntar as frações mais ricas e trocar Tampão de Eluição por Tampão de Diálise em concentradores de amostra.

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

12. Recolher as frações a partir dos concentradores e analisar através de dosagem enzimática pelo método do BSA e análise imunológica através de Western Blot.

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).

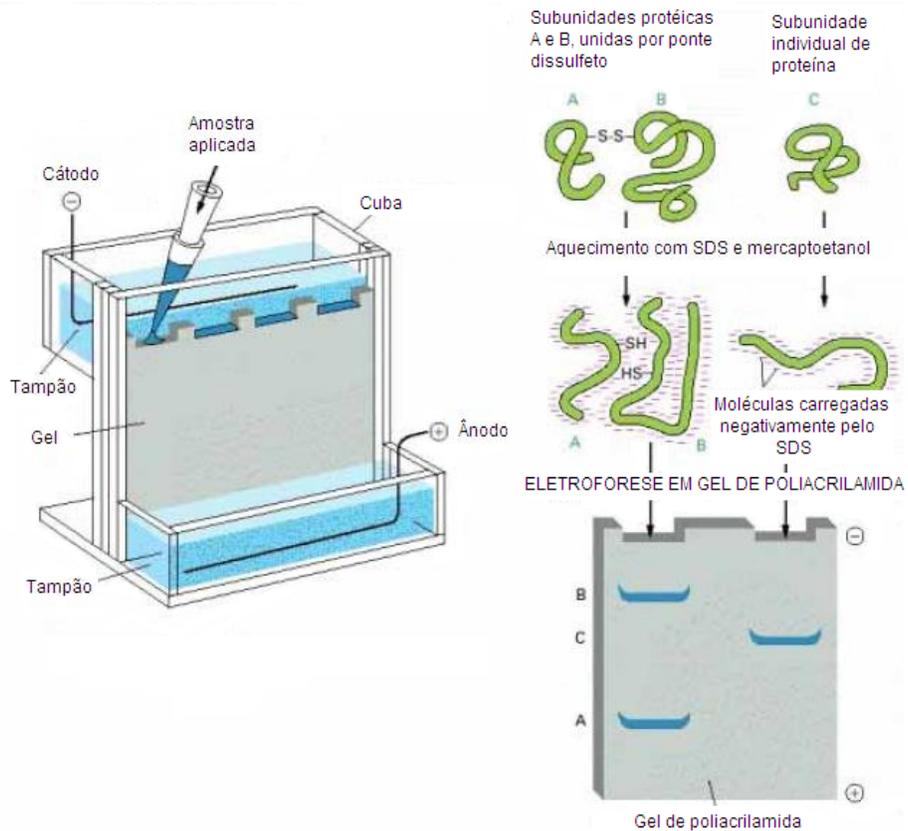


Figura 2. Esquema de montagem do cassete de transferência por Western Blotting. Adaptado do manual de instruções do sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad).

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.

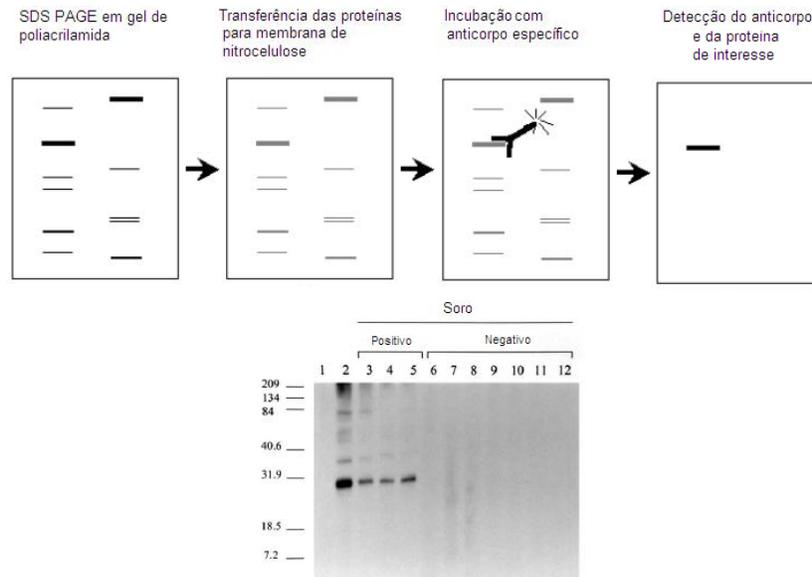


Figura 3. Esquema geral do Western Blotting. Adaptado do manual de instruções do sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad).

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.

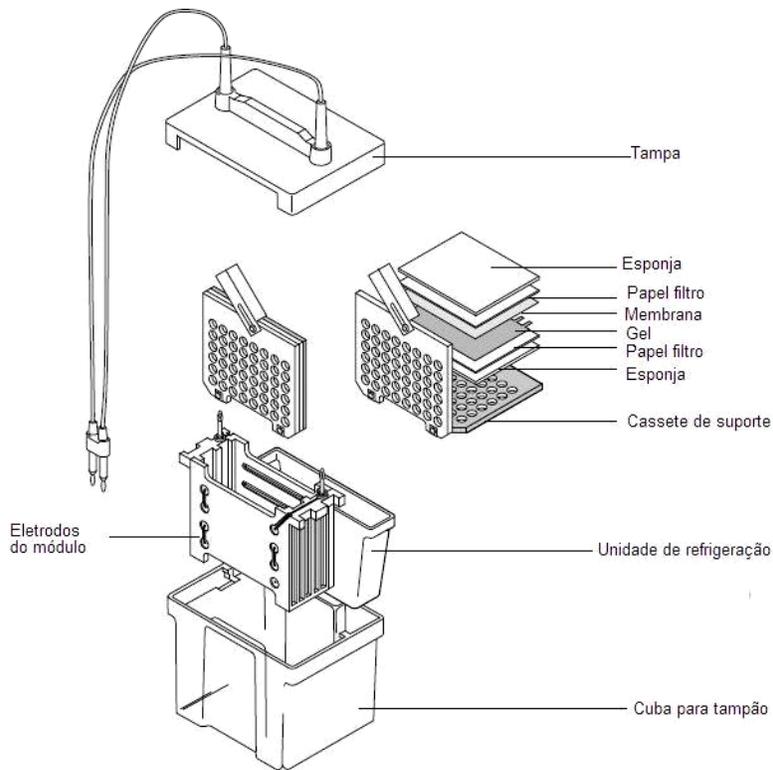


Figura 4. Esquema de montagem do cassete de transferência por Western Blotting. Adaptado do manual de instruções do sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad).

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 pissete, 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



Seqüências depositadas têm várias notações biológicas, como:

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

Promove a notação funcional de proteínas.

1) Explorando os bancos de dados secundários. Exemplos:

SWISS-PROT e TrEMBL

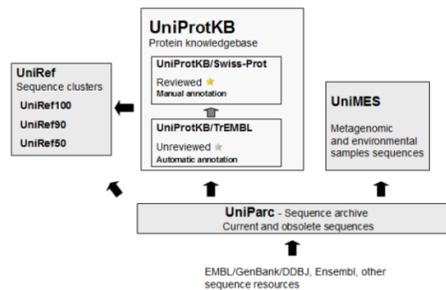


- SWISS-PROT foi criado em 1986 pelo Departamento de Bioquímica Médica da Universidade de Genebra e EMBL.
- Atualmente é mantido pelo Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) e EBI/EMBL.
- Este banco mantém um alto nível de anotações, como a descrição e a função da proteína, estrutura dos seus domínios, 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.

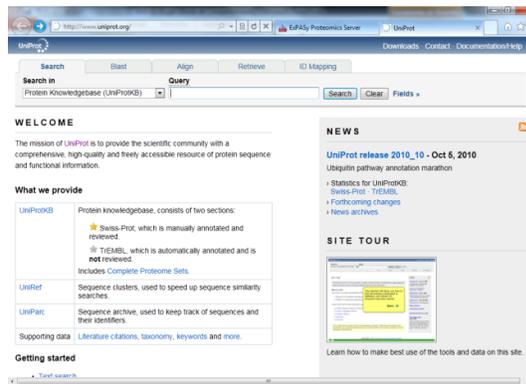
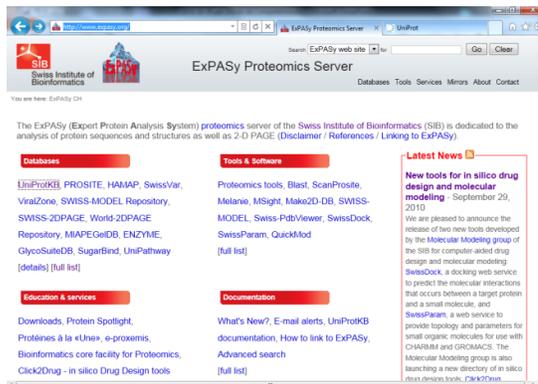
Acesse: <http://www.expasy.org/>



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**).

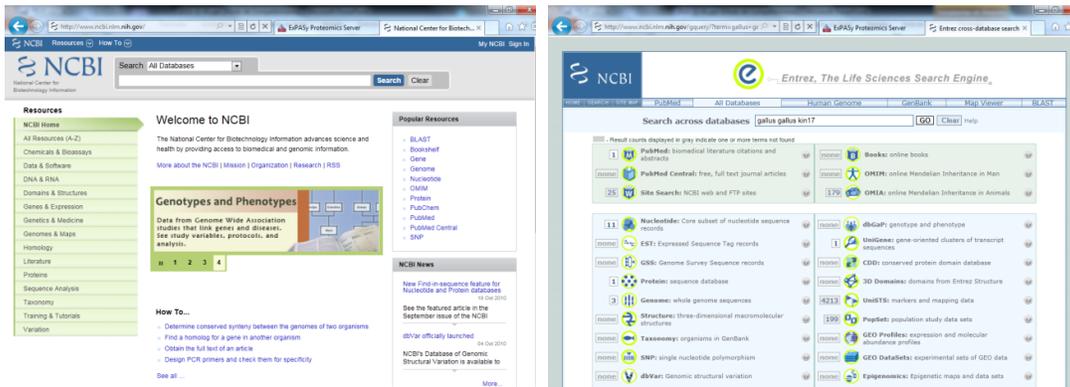
O banco de dados UniProt Metagenomic and Environmental Sequences (**UniMES**) é um repositório de dados desenvolvido especificamente para metagenômica e dados ambientais.



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 sequência de aminoácidos desta proteína, sua função e propriedades.

Ferramentas: Swiss tools / **Translate**
UniprotKB / **Blast**

Exercício 1:

- 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 seqüências usando o UniprotKB/**Alignment**
- 4) Explore as similaridades entre elas selecionando as propriedades dos aminoácidos.

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

Exercício 2:

Usando a ferramenta expasy/**ProtParam**, insira o código da sequência da proteína encontrada no SwissProt, ou copie e cole a sequência 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

$$Abs = \epsilon.d.c$$

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?

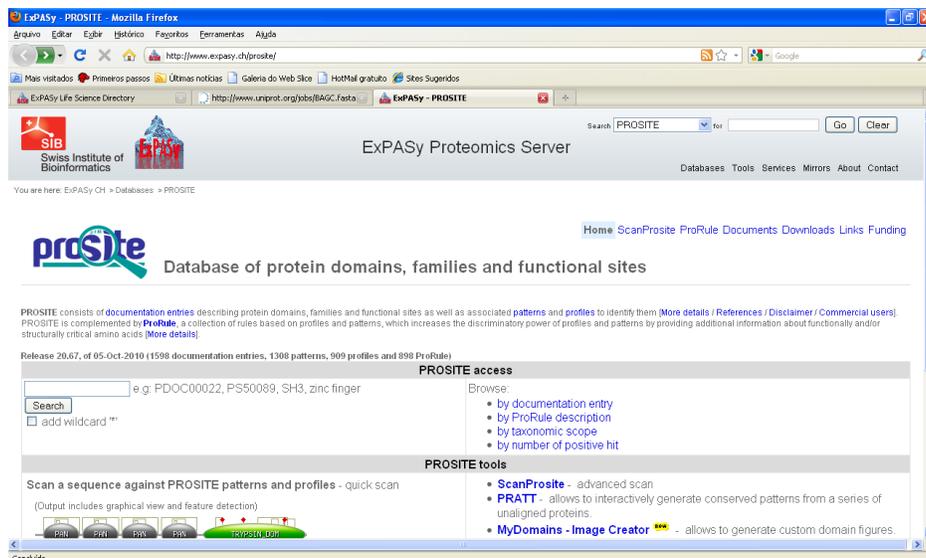
Exercício 3:

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 seqüência 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 seqüência 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 seqüência de aminoácidos.

- 1) Usando as ferramentas expasy/**GOR** e expasy/**Jpred** insira a seqüência 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>

Nomenclature	Reaction & Specificity	Functional Parameters
Enzyme Names	Pathway	Km Value
EC Number	Catalysed Reaction	Ki Value
Common/ Recommended Name	Reaction Type	IC50 Value
Systematic Name	Natural Substrates and Products	pI Value
Synonyms	Substrates and Products	Turnover Number
CAS Registry Number	Substrates	Specific Activity
	Natural Substrate	pH Optimum
	Products	pH Range
	Natural Product	Temperature Optimum
	Inhibitors	Temperature Range
	Cofactors	
	Metals/Ions	Organism-related information
Isolation & Preparation	Activating Compounds	Organism
Purification	Ligands	Source Tissue
Cloned	Ligand Views NEW	Localization
Renatured		Protein-Specific Search
Crystallization		

Exercício 8:

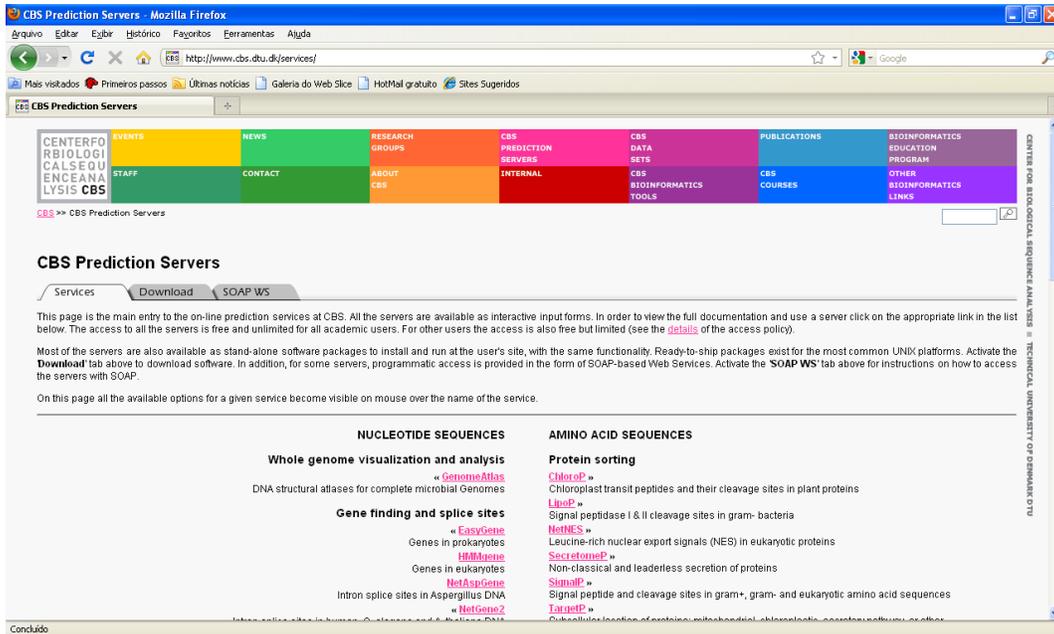
- 1) Buscar o *E.C.*, o K_M , o *pH ótimo* e *temperatura ideal* da catalase bovina (*Bos taurus*) e de fungo (*Aspergillus. agaricus*), na sua forma livre.
- 2) Busque estas informações para outras enzimas de seu interesse.

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 Perfil celular, a Classe enzimática e a Categoria ontológica do gene a partir de uma sequência de aminoácidos.

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

- 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 prever 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:

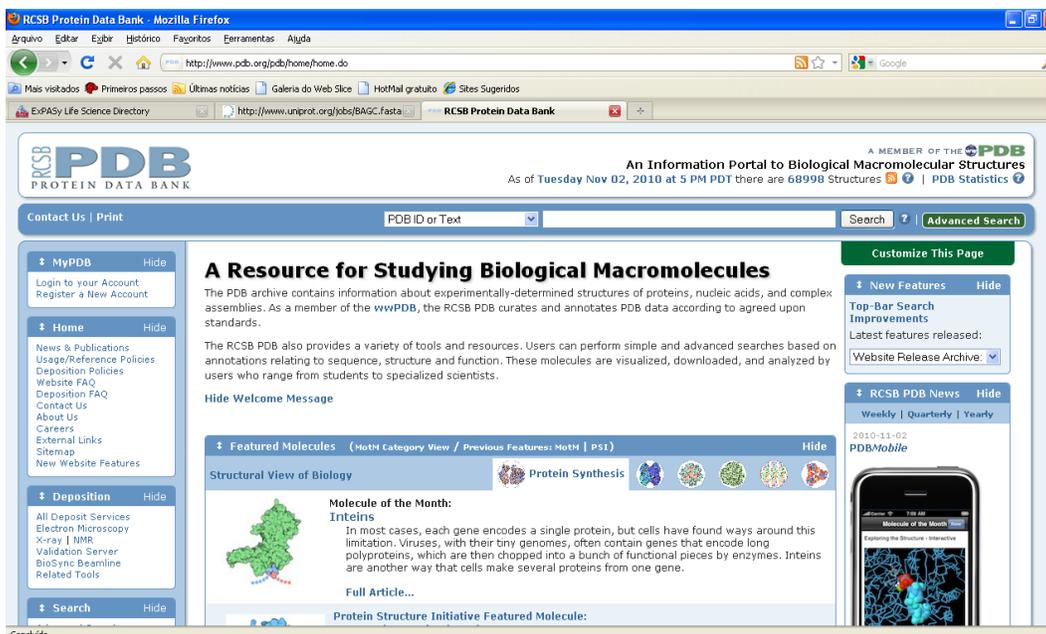
1971 – Início do PDB no Brookhaven National Laboratory com 7 estruturas.

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>



The screenshot shows the RCSB Protein Data Bank website. The browser title is "RCSB Protein Data Bank - Mozilla Firefox". The address bar shows "http://www.pdb.org/pdb/home/home.do". The page content includes a search bar with "PDB ID or Text" and a search button. A sidebar on the left contains links for "MyPDB", "Home", "Deposition", and "Search". The main content area is titled "A Resource for Studying Biological Macromolecules" and features a "Molecule of the Month" section for "Intein". The text describes how genes encode proteins and how inteins are processed. A 3D molecular model of the Intein is shown. The page also includes a "Featured Molecules" section and a "Protein Structure Initiative Featured Molecule" section.

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/>

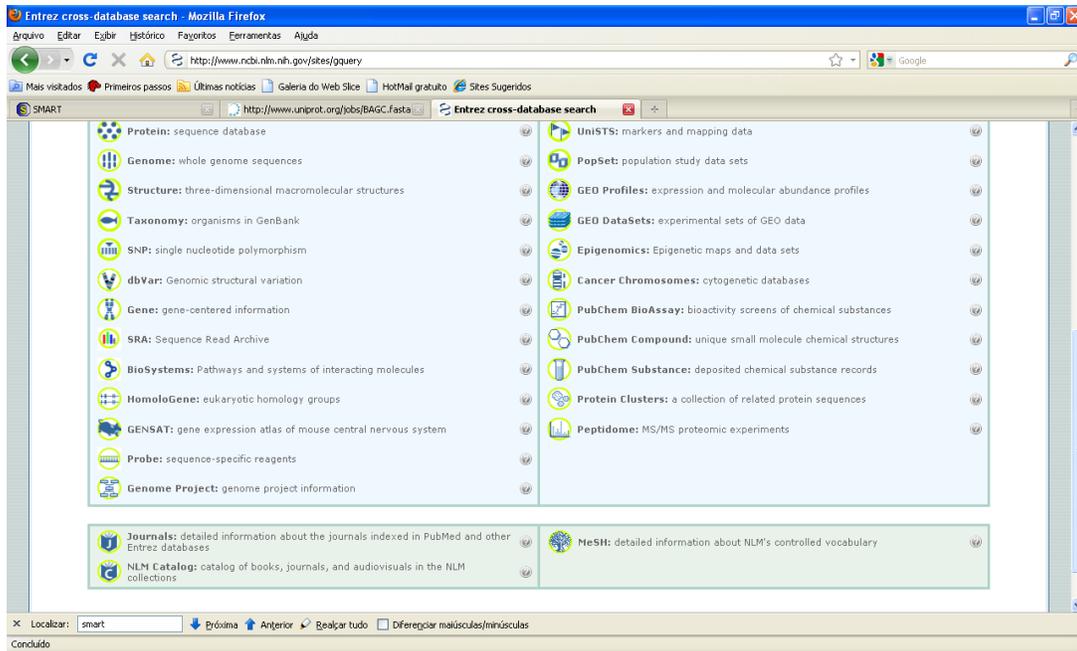
Chemistry Library (UW-Madison): <http://chemistry.library.wisc.edu/resources/>

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

```
PQITLWQRPLVTIRIGGQLKEVLLDTGADDTVLEEMNLPKWKPKMIGGIGGF IKVRQYDQILI
EICGHAIGTVLVGPTPVNI IGRNLLTQIGCTLNFSGSPQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALL
DTGADDTVLEEMSLPGRWPKPKMIGGIGGF IKVRQYDQILIEICGHKVIIGTVLVGPTPVNI IGRN
LLTQIGCTLNF
```

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:

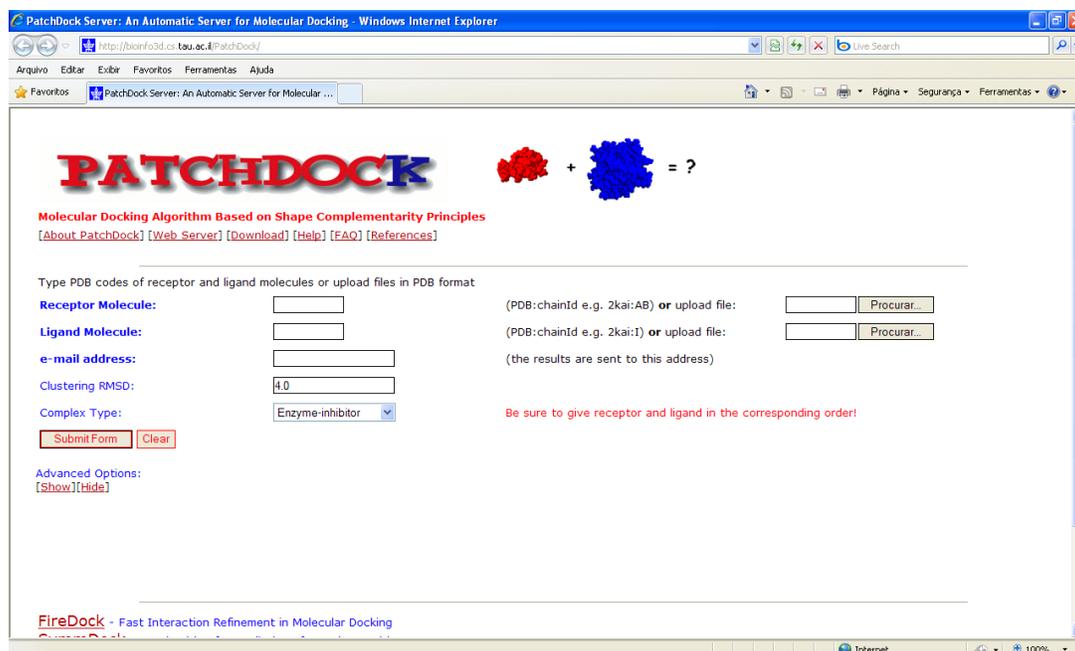
Ferramenta: **Patchdock server** (at <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>)

Inputs:

Receptor: query.pdb Ligand: ligand.pdb

Docking – Ferramenta de “Drug discovery”

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



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. 2007. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol.* 17(2):72-9.

LEACH AR. 2001. *Molecular modeling: Principles and applications.* 2nd ed. Prentice Hall, p784.

KIEFER F, ARNOLD K, KÜNZLI M, BORDOLI L, SCHWEDE T. 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 37:D387-D392.

KOPP J AND SCHWEDE T. 2004. The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models. *Nucleic Acids Res.* 32:D230-D234.

NELSON DL, COX MM. 2007. *Lehninger princípios de bioquímica.* São Paulo: Sarvier, p1202.

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

REHM H. 2006. *Protein Biochemistry and proteomics.* London:Elsevier. p236.

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

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

ŠTROS, M. 2010. HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1799:101–113.

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

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

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

YE SQ. 2008. *Bioinformatics a practical approach.* London:Chapman & Hall/CRC. p618.

FUNGOS E CONTROLE DA POLUIÇÃO AMBIENTAL

Jaqueline da Silva Coelho-Moreira
Caroline Aparecida Vaz de Araújo
Thatiane Rodrigues Mota

INTRODUÇÃO

As moléculas orgânicas de difícil degradação, denominadas “recalcitrantes”, podem ser de origem natural, sintetizadas pelo metabolismo dos organismos, ou sintética, produzidas por indústrias e estranhas ao ambiente e, por esta razão, são denominadas “xenobióticas” (do grego *xenos* = estrangeiro). Desde o início do século XX, moléculas xenobióticas vêm sendo lançadas no ambiente e compreendem vários tipos de compostos oriundos principalmente de atividades industriais e da agricultura, como por exemplo, agrotóxicos, corantes, fármacos, polímeros e plásticos. Muitos dos xenobióticos e/ou seus produtos de degradação representam potenciais ameaças aos organismos vivos, podendo provocar desde sérias intoxicações até efeitos mutagênicos em diversos organismos da comunidade biológica afetando a estrutura e funcionamento do ecossistema, além da saúde humana. Por estas razões, há um crescente interesse em desenvolverem novas tecnologias para descontaminar ambientes poluídos por xenobióticos.

Este mini-curso irá abordar os processos biológicos de descontaminação ambiental baseados na utilização de fungos filamentosos, uma tecnologia conhecida como biorremediação.

Visto que, as atividades industriais e a agricultura são as principais fontes poluidoras do ambiente e que as classes de moléculas xenobióticas são inúmeras, o nosso mini-curso tem como foco duas classes de compostos amplamente utilizados nestas atividades, os corantes e os agrotóxicos da classe dos herbicidas.

Corantes

Os corantes sintéticos são muito utilizados em diversos tipos de indústrias, como a têxtil, farmacêutica, alimentícia, cosméticos, papel, entre outras.

Aproximadamente 10.000 tipos de corantes e pigmentos são utilizados nas indústrias e mais de 7×10^5 toneladas de corantes sintéticos são produzidos anualmente

no mundo. Em 1996 a produção mundial de corantes foi de 8×10^5 toneladas (Heinfling et al., 1998).

A principal característica dos efluentes gerados nas indústrias têxteis é presença de uma água residual contendo elevada carga orgânica, cor acentuada e compostos tóxicos (figura 1), ao homem e ao meio ambiente (Paschoal e Tremiliosi-Filho, 2005).

De acordo com a estrutura dos corantes e o seu potencial tóxico, genotóxicos e mutagênico, a maioria deles representam um perigo para todas as formas de vidas, podendo afetar vários órgãos e sistemas dos animais, causar reações alérgicas, dermatoses, além de propriedades carcinogênicas e mutagênicas que são atribuídas principalmente aos corantes com ligações azo ou nitro-amino, os quais podem causar tumores de fígado e bexiga de animais em experimentos.



Figura. 1: Empresa têxtil despejando efluente no ribeirão Jacaré em área rural de Itatiba-SP (2007). Foto Gustavo Franco

Herbicidas

Desde 2008, o Brasil ocupa o posto de maior consumidor de agrotóxicos do mundo. O consumo destes compostos vem crescendo a cada ano; em 2011 houve um crescimento de 10% em relação ao ano anterior. As vendas foram impulsionadas principalmente pelas culturas de soja, cana, milho, algodão, café e pastagem (Sindag, 2012).

Atualmente, os agrotóxicos da classe dos herbicidas estão entre os mais utilizados, juntamente com os inseticidas e fungicidas (figura 2).

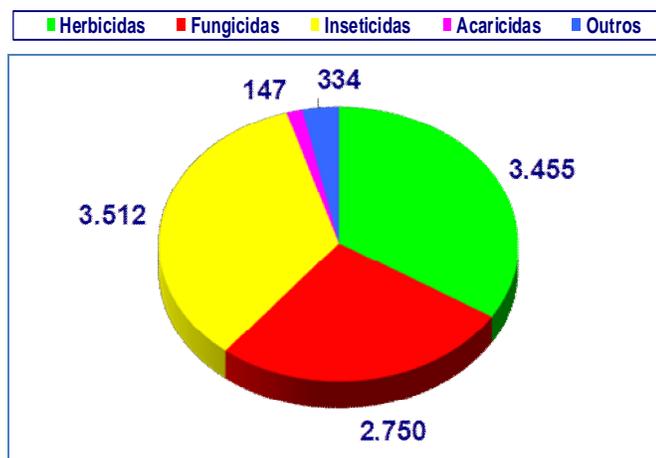


Figura 2. Estimativa do mercado de agrotóxicos acumulado em 2011 (Milhões R\$). Fonte: Sindag, 2012.

Descontaminação do ambiente

Apesar da grande diversidade de substâncias químicas lançadas no ambiente, existe uma atenuação natural da poluição em locais contaminados. Na verdade, vários processos químicos, físicos e biológicos podem ocorrer para evitar o acúmulo de poluentes no ambiente. Estes processos incluem a volatilização, oxidação abiótica, hidrólise e biodegradação por microrganismos nativos (Gianfreda & Rao, 2004). No entanto, dependendo da estrutura química da molécula, do modo e quantidade correta de aplicação e das características gerais do ambiente, ocorre o acúmulo a índices considerados tóxicos (Chowdhury et al. 2008).

Compostos químicos poluentes podem ser eliminados do ambiente por incineração, lavagem dos solos e outras técnicas convencionais. Contudo, estes métodos apresentam altos custos e impactos negativos sobre o ambiente. A biorremediação mostra-se como uma alternativa competitiva, pois, o uso de sistemas biológicos pode apresentar baixo custo e mínimo impacto ambiental em relação aos processos convencionais.

Biodegradação e Biossorção

A biorremediação é uma tecnologia alternativa de tratamento de locais contaminados com xenobióticos e baseia-se no uso de sistemas biológicos, como bactérias, fungos e enzimas, na degradação de poluentes ambientais. Por ser uma forma natural de degradação de compostos químicos, promove um tratamento adequado, sendo de baixo custo e de mínimo impacto ambiental em relação às técnicas convencionais de remediação.

Os corantes e herbicidas, de uma forma geral, apresentam uma estrutura complexa, quimicamente e fotoliticamente estável e resistente aos processos de degradação naturais. No caso dos corantes, mesmo em com baixas concentrações, os efluentes gerados apresentam altas quantidades de compostos orgânicos e coloração intensa na água.

O ideal é que os produtos da biodegradação tenha estrutura menos recalcitrantes em relação à molécula original ou na mineralização (conversão total dos compostos orgânicos) do xenobiótico, produzindo compostos químicos simples como: CO_2 , H_2O , NH_3 , SO_4^{-2} , PO_4^{-2} (Gaylarde et al., 2005).

Nas últimas décadas, a possibilidade de utilizar fungos basidiomicetos em estratégias de biorremediação tem obtido êxito nas pesquisas devido à habilidade destes fungos de degradar uma grande variedade de poluentes ambientais altamente persistentes por meios inespecíficos. Dentre os basidiomicetos mais utilizados estão os que causam a podridão branca da madeira.

Como um dos processos de biorremediação, a biossorção desempenha uma significativa função na remoção de xenobióticos de águas contaminadas. A biossorção é um processo físico-químico que envolve a adsorção de um composto químico na superfície celular de um material biológico que pode estar vivo ou morto (fungos, bactérias e algas). Os principais atrativos da biossorção são a alta seletividade e eficiência, baixo custo e bom desempenho de remoção (Aksu, 2005). Outro processo comumente utilizado é a bioacumulação, baseado na incorporação do composto dentro da célula viva.

Biorremediação por fungos da podridão branca da madeira (White rot fungi)

Os fungos são importantes componentes da microbiota e apresentam atividade degradativa de amplo espectro, podendo secretar grande diversidade de enzimas extracelulares, o que os torna capazes de metabolizar os mais diversos tipos de moléculas, incluindo compostos xenobióticos. Em seu ambiente natural, os fungos degradam polímeros contidos na madeira como a celulose, hemicelulose e lignina, a partir dos quais obtém energia para seu crescimento e reprodução. Os fungos da podridão branca (figura 3) são os únicos microrganismos capazes de degradar todos os polímeros da madeira, incluindo a lignina.



Figura 3: Trametes villosa (Sw.) Kreisel (Foto: A. M. Gugliotta).
Fonte: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br>

A lignina é um polímero aromático e heterogêneo que fornece resistência ao tecido vegetal (figura 4). Sua complexa e irregular estrutura química faz da lignina muito resistente ao ataque de enzimas, sendo impossível sua absorção e degradação por mecanismos intracelulares. Por isso, os fungos da podridão branca da madeira

desenvolveram mecanismos muito inespecíficos, baseados em enzimas extracelulares, para a degradação da lignina.

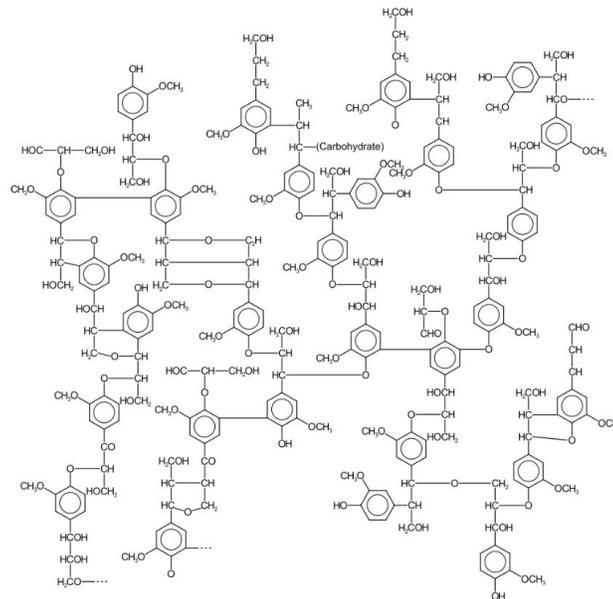


Figura. 4: Estrutura química da lignina

Foi com o entendimento do sistema enzimático de degradação da lignina por fungos da podridão branca que se propôs que os mesmos poderiam ser utilizados na degradação de poluentes ambientais. Esta capacidade deve-se à semelhança entre as estruturas da lignina e alguns compostos orgânicos sintéticos (Figura 5).

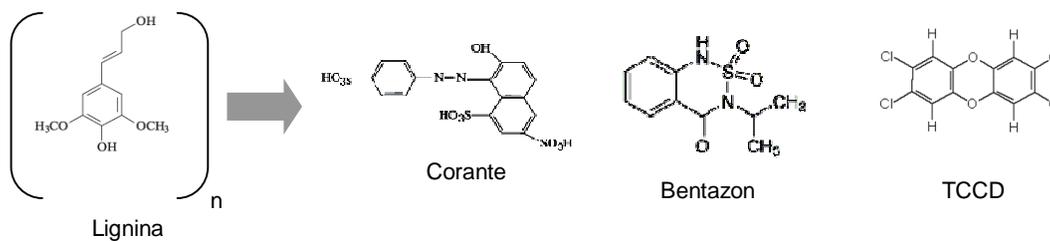


Figura 5: Comparação entre a estrutura química da lignina e de alguns compostos xenobióticos.

As enzimas microbianas mais importantes nos processos de biorremediação são a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac). A natureza inespecífica do processo de degradação permite que essas enzimas sejam utilizadas na degradação ou mineralização de compostos com alta persistência.

Entre os fungos filamentosos, *Phanerochaete chrysosporium* tornou-se um sistema modelo para o estudo da degradação de xenobióticos sendo conhecida sua capacidade de degradar muitas classes de compostos, inclusive pesticidas, tais como bentazon, diuron, isoproturon e isoxaflutol (Castillo et al. 2000, Castillo et al. 2001, Fratila-apachitei et al. 1999, Mougin et al. 2000). O sucesso desta espécie de basidiomiceto tem estimulado estudos sobre outros fungos ligninolíticos com potencial para a biorremediação. É o caso de *Pleurotus pulmonarius*, *Coriolus versicolor* e *Tremetes versicolor* (Masaphy et al. 1996, Hiratsuka et al. 2001, Uhnáková et al. 2009). Grande parte dos estudos aponta as enzimas ligninolíticas extracelulares como principais responsáveis pelos processos degradativos de moléculas poluentes.

Isolamento de microrganismos a partir do solo

O isolamento de microorganismos permite o estudo detalhado de suas vias metabólicas, enzimas e produtos intermediários. E o isolamento permite detectar que tipo de degradação está ocorrendo no ambiente (catabólica ou cometabólica) (Melo e Azevedo, 1997).

Na mineralização, a biomassa da população aumenta às custas do substrato e este diminui de concentração. Neste caso, as moléculas são quebradas em moléculas inorgânicas, tais como CO₂, CO, H₂O, NH₃, H₂S e HCl. Sendo este, portanto, o único meio de se eliminar totalmente o composto xenobiótico do ambiente.

No caso do cometabolismo, não há dispêndio de energia. Neste caso, o crescimento microbiano requer a presença de um substrato secundário como fonte de

carbono e energia, podendo transformar a molécula sem retirar dela a energia para o seu desenvolvimento.

As populações degradadoras de pesticidas representam uma pequena fração da parcela total de microorganismos. Eles podem ser isolados de solos, águas, sedimentos e áreas contaminadas com pesticidas, ou ainda, pode-se recorrer à áreas agrícolas com histórico de aplicação de pesticidas.

Um caminho mais rápido e direto é realizar o isolamento seletivo de um determinado grupo de microorganismos previamente testados como eficientes agentes degradadores.

A comunidade microbiana, o número e o tipo de microorganismos encontrados são definidos pelas particularidades do reservatório do qual foram isolados, o solo. As influências mais comuns à atividade microbiana são: a localização geográfica, a temperatura, umidade, pH e aeração do solo, logo, também afetam diretamente na degradação de pesticidas no solo.

A procura de microorganismos degradadores de xenobióticos pode estar direcionada às áreas de aplicabilidade de pesticidas e o insucesso deste isolamento pode estar relacionado à recalcitrância da molécula em estudo, dificultando a sua degradação.

Quando o objetivo da coleta é somente o isolamento de microorganismos úteis com potencial de degradação, geralmente, procede-se a coleta diretamente da área de estudo, coletando-se pequenas sub-amostras e homogeneizando-as, para posterior análise. Deve-se observar também no ato da coleta informações adicionais do local, tais como: o tipo e o horizonte do solo para referências futuras.

Do mesmo modo, o transporte e o armazenamento do material devem ser feitos com cuidado para que a população microbiana não se altere. O ideal seria que as condições da amostra fossem mantidas em laboratório nas mesmas do ambiente, mas como isso é improvável, recomenda-se proceder ao isolamento imediatamente após a coleta ou poucos dias após, sendo que o ideal é que as análises sejam feitas em até 6 horas após a coleta.

Recomenda-se coletar as amostras nos cinco primeiros centímetros do solo, pois é nessa profundidade que a maioria dos microorganismos habita. Se na área amostrada não se encontrar um grande número de microorganismos, pode-se recorrer ao isolamento a partir de solo rizosférico ou raízes.

Técnicas de enriquecimento do solo e suplementação do meio de cultura com o pesticida em estudo tem a vantagem de estimular os microorganismos com potencial de

utilização do composto, como fonte de nutrientes, com vantagem seletiva em detrimento aos outros microorganismos que abundam naquele solo.

Um problema que surge no enriquecimento de solos é a toxicidade, insolubilidade em água, volatilidade das substâncias xenobióticas. Os meios de cultura para isolamento geralmente são compostos de uma solução de sais minerais suplementada com o composto xenobiótico em estudo, que é usado como fonte de carbono. Um diagnóstico rápido para identificar biodegradadores é observar a mudança de coloração do meio de cultura ou halo de degradação ao redor das colônias, em função do uso de indicadores ácido-base.

Um exemplo ilustrativo é o herbicida 2,4-D, usando-se o indicador vermelho de bromocresol em um meio de sais minerais com 2,4D como única fonte de carbono e extrato de levedura como fator de crescimento. A oxidação microbiana do 2,4D resulta na produção de HCl, mudando a cor do meio de vermelho (pH 7,0) para amarelo (pH 5,2).

Inicialmente, quando os microorganismos são expostos a um determinado xenobiótico, geralmente há um período inicial de adaptação onde nenhuma mudança é observada. E essa fase de adaptação finaliza quando o início da biodegradação é detectado.

REFERÊNCIAS

- Aksu, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review (2005). *Process Biochemistry*, v. 40, p. 997-1026.
- Biodegradação de pentaclorofenol por *Trametes villosa* (Sw.) Kreisel: análises bioquímicas e moleculares. Disponível em: http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/teses/2011/t_luciana_jandelli_gimenes.html. Acesso em 06 de maio de 2012.
- Castillo MDP, Ander P, Stenström J, Torstensson L. Degradation of the herbicide bentazon as related to enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in two solid substrate fermentation systems (2000). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (3), 289-295.
- Castillo MDP, Von Wirén-Lehr S, Scheunert I, Torstensson L. Degradation of isoproturon by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* (2001). *Biology and Fertility of Soils*, 33 (6), 521-528.
- Chowdhury A, Pradhan S, Saha M, Sanyal N. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies (2008). *Indian Journal of Microbiology*. 48, 114-127.
- Fratila-Apachitei LE, Hirst JA, Siebel MA, Gijzen HJ. Diuron degradation by *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 in synthetic and natural media (1999). *Biotechnology Letters*, 21, 147-154.
- Gaylarde CC, Bellinaso MDL, Manfio GP. Biorremediação: aspectos biológicos e teóricos da biorremediação de xenobióticos (2005). *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*, nº 34.
- Gianfreda L, Rao MA. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soil: a review (2004). *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 339-354.
- Heinfling A, Martínez J, Martínez AT. Transformation of industrial dyes by manganese-independent reaction (1998). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 2788-2793.
- Hiratsuka N, Wariishi N, Tanaka H. Degradation of diphenyl ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor* (2001). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 563-571.
- Masaphy S, Levanon D, Henis Y. Degradation of atrazine by the lignocellulolytic fungus *Pleurotus pulmonarius* during solid-state fermentation (1996). *Bioresource Technology*, 56, 207-214.
- Mougin C, Boyer FD, Caminade E, Rama R. Cleavage of the diketone nitrile derivative of the herbicide isoxaflutole by extracellular fungal oxidases (2000). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (10), 4529-4534.

Paschoal, F.M.M.; Tremiliosi-Filho, G. Aplicação da Tecnologia de eletrofloculação na recuperação do corante índigo blue a partir de efluentes industriais (2005). Química Nova, v. 28, n. 5, p. 766-772.

Sindag. Sindicato Nacional da indústria de produtos para defesa agrícola. Dados de mercado, vendas janeiro/outubro 2011. Disponível em: http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php. Acesso em 9 de maio de 2012.

Uhnáková B, Petříčková A, Biedermann D, Homolka L, Vejvoda V, Bednář P, Papoušková B, Sulc M, Martínková L. Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase of *Trametes versicolor* (2009). Chemosphere, 79 (6), 826-832.

DESLIGNIFICAÇÃO BIOLÓGICA DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS PARA A OBTENÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Prof^a Dr^a Rosane Marina Peralta
Prof^a Dr^a Cristina Giatti Marques de Souza
Mestranda Josielle Abrahão
Mestrando Rafael Castoldi
Doutoranda Gisele Bazanella
Doutoranda Fabíola Dorneles Inácio

INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica constitui a maior fonte de carboidratos poliméricos naturais do mundo que, após hidrólise a açúcares monoméricos, podem ser fermentados para produção de importantes produtos, incluindo o bioetanol. Entretanto, tanto a hidrólise química quanto a enzimática dos polissacarídeos é altamente problemática, tendo em vista que na natureza os carboidratos poliméricos estão intrinsecamente unidos à lignina, um polímero fenólico altamente recalcitrante. A lignina é de difícil degradação porque é um polímero tridimensional interconectado através de diversas ligações carbono-carbono e outras ligações que não são hidrolisáveis em condições biológicas. A remoção da lignina tem sido considerada um pré-requisito para uma utilização eficiente dos carboidratos dos materiais lignocelulósicos (BORTOLAZZO, 2011; SMITH et al., 1987).

Diversas estratégias para a conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis têm sido demonstradas em escala laboratorial e piloto. O conceito geral envolve pré-tratar a matéria bruta para, então, submetê-la à hidrólise enzimática. Pré-tratamentos físico-químicos tais como tratamentos ácidos e alcalinos e a explosão a vapor são bastante conhecidos para melhorar a conversão da biomassa celulósica em açúcares monoméricos. Entretanto, estes tratamentos requerem grande quantidade de energia e frequentemente geram produtos tóxicos, tornando-os inviáveis economicamente e ambientalmente indesejáveis. Pré-tratamentos brandos e ambientalmente adequados com baixa ou nenhuma produção de poluentes são desejáveis e têm sido objeto de vários estudos. Dentro deste conceito, encaixam-se os

pré-tratamentos biológicos dos materiais lignocelulósicos. Tais tratamentos exploram a habilidade de certos microrganismos em degradar a parede celular das plantas (CANILHA et al., 2009; AGUIAR & FERRAZ, 2011).

Os fungos filamentosos estão entre os organismos mais utilizados na produção de enzimas com interesse biotecnológico. Estas enzimas são amplamente utilizadas nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, de papel, têxtil, na produção de etanol, etc. No processamento do álcool, os fungos e suas enzimas podem ser inseridos nos processos de pré-tratamento biológico e de sacarificação enzimática da celulose e hemicelulose (CONCEIÇÃO et al., 2005).

Os basidiomicetos causadores da podridão branca da madeira são considerados os organismos mais aptos para degradar a lignina, por produzirem um sistema enzimático extracelular não específico consistindo em enzimas oxidativas, especialmente as lacases e as peroxidases (lignina peroxidase e manganês peroxidase), além da produção de enzimas como as feruloil esterases, que removem fenólicos ligados aos carboidratos (AGUIAR & FERRAZ, 2011).

Dentro deste contexto, o bioetanol ou etanol de segunda geração (produzido a partir da biomassa lignocelulósica) vem sendo mundialmente considerado uma importante alternativa ao uso da gasolina. O potencial da transformação de componentes da biomassa em açúcares baseia-se na hidrólise enzimática completa da celulose visando à produção de etanol. A hidrólise enzimática ocorre através da ação de enzimas celulolíticas na biomassa. As enzimas celulolíticas são produzidas por diferentes microrganismos, sendo fungos filamentosos os mais eficientes produtores. Assim, o desenvolvimento de tecnologias que permitem produzir etanol a partir de resíduos agroindustriais lignocelulósicos poderá diminuir o problema do seu descarte na indústria, tornando o resíduo comercial (SOCCOL et al., 2011; CANILHA et al., 2009).

ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é uma mistura complexa de polímeros naturais de carboidratos conhecidos como celulose, hemicelulose, além de lignina e pequenas quantidades de outras substâncias, como extrativos e cinzas. Estes materiais lignocelulósicos representam a fração mais expressiva da biomassa vegetal e a maior fonte de compostos orgânicos da biosfera. Estas frações perfazem mais de 90% da massa seca total e, em nosso planeta, vários componentes da biomassa estão disponíveis

para a conversão em bioprodutos. Dentre estes podem ser inclusos partes da planta (semente, caule), constituintes da planta (lipídeos, proteínas, fibras, etc.), bioprodutos processados, material de origem marinha, resíduo industrial, etc. (SMITH et al., 1987; CANILHA et al., 2009).

A celulose é o componente mais abundante nos materiais lignocelulósicos e corresponde cerca de 50% da massa seca total. Trata-se de um polímero linear, possuindo porções amorfas e cristalinas, formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose unidas por ligações β -(1,4)-glicosídicas (FENGEL & WEGENER, 1989; HENRIKSSON & LENNHOLM, 2009; CASTRO & PEREIRA, 2010) (Fig. 1). A estrutura linear, conferida pela configuração das ligações glicosídicas, possibilita a formação de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares e acarreta na agregação das cadeias celulósicas em “fibrilas elementares” com alto grau de cristalinidade. Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornam a celulose insolúvel em um grande número de solventes e explicam, pelo menos em parte, a sua resistência à degradação microbiana (DING & HIMMEL, 2006; MATTHEWS, 2006).

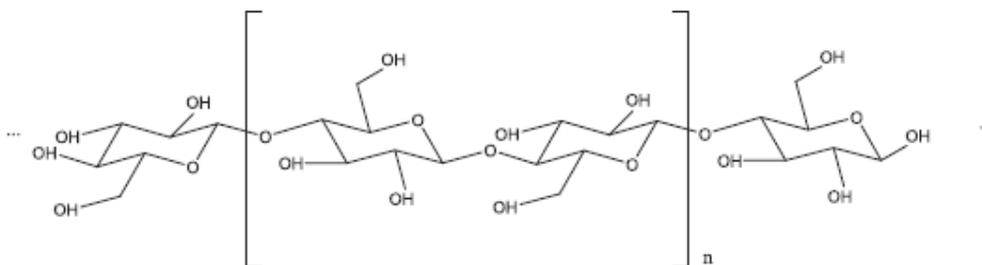


Fig. 1 Estrutura da fração celulósica (CASTRO & PEREIRA, 2010).

As hemiceluloses são polissacarídeos ramificados e de menor massa molar que a celulose. São compostas por vários açúcares como a glicose, manose, galactose e xilose, além de pequenas quantidades de arabinose, ácidos urônicos e grupos acetila. O maior polímero de hemicelulose é o xilano (Fig. 2). O teor de hemicelulose em diferentes tipos de materiais lignocelulósicos pode variar de 20 a 25% (FENGEL & WEGENER, 1989; GUIMARÃES et al., 2006). Estruturalmente, a hemicelulose é mais parecida com a celulose do que com a lignina e é depositada na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem

facilmente com a celulose, dando flexibilidade e estabilidade ao agregado (RAMOS, 2003).

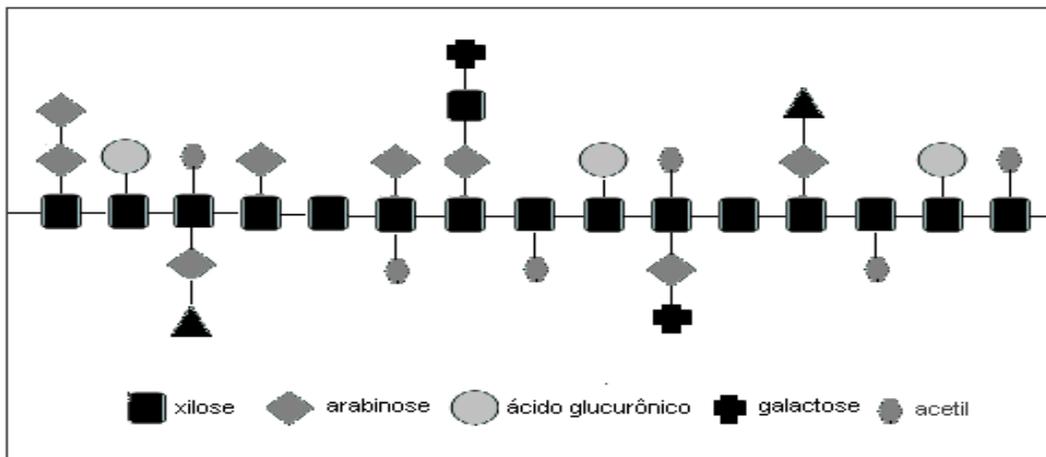


Fig. 2 Representação esquemática do xilano (VRIES & VISSER, 2001).

Comparada às celuloses, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos. Sua natureza química varia nas plantas em relação ao tipo de tecido vegetal e espécies a quem pertencem. As madeiras em geral possuem de 20-30% de hemicelulose na composição geral, enquanto que nas gramíneas esse valor é de 20-40% (SJÖSTRÖM, 1992).

A lignina difere significativamente dos polissacarídeos, pois é, de fato, uma macromolécula aromática formada a partir do acoplamento radicalar de alcoóis hidroxi-cinâmicos (Fig. 3). Em massa, esse componente representa cerca de 20-30% do material lignocelulósico seco (RALPH et al., 2004).

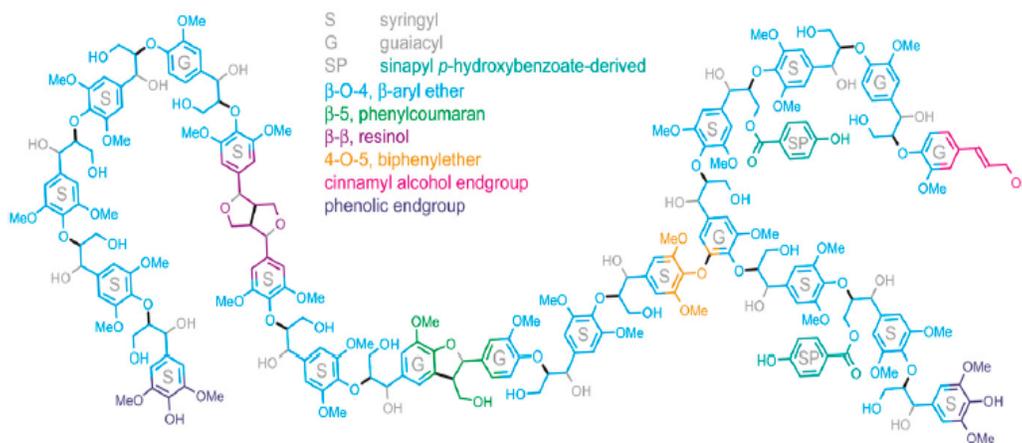


Fig. 3 Representação do polímero de lignina (BOERJAN et al., 2010).

A lignina é uma macromolécula complexa e constitui a fração não polissacarídica mais abundante da lignocelulose. Envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção à degradação química e/ou biológica, e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose. Enquanto as paredes celulares de gramíneas apresentam os menores teores de lignina, aquelas de madeiras de coníferas (*softwoods*) são as mais ricas neste componente (KUHAD et al., 1997).

Os componentes citados anteriormente estão intimamente associados e/ou ligados quimicamente, formando a parede celular dos vegetais lenhosos (Fig. 4).

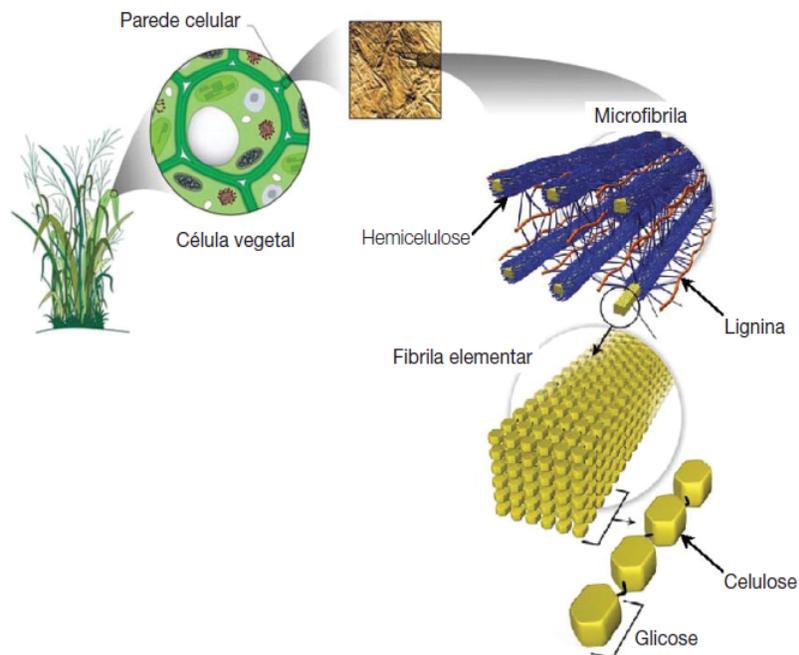


Fig. 4 Arquitetura da parede celular vegetal.

A parede celular em questão apresenta baixa porosidade, o que impede a infiltração de moléculas de elevada massa molar, como as proteínas. Justamente a ultraestrutura coesa e a parede celular não porosa correspondem à grande barreira ao processo biodegradativo. Dessa forma, o grupo de organismos aptos a degradar os materiais lignocelulósicos é bastante restrito. Estes organismos desenvolveram sistemas metabólicos complexos que permitem desestruturar a parede celular e despolimerizar seus componentes, gerando substâncias susceptíveis ao metabolismo intracelular dos mesmos (FENGEL & WEGENER, 1989; AKTHAR et al., 1998).

FUNGOS DA PODRIDÃO BRANCA DA MADEIRA E ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

Os fungos são microrganismos unicelulares (leveduras) ou multicelulares (filamentosos). Em termos ecológicos, os fungos filamentosos promovem dois tipos majoritários de biodeterioração dos materiais lignocelulósicos: a podridão castanha (ou parda) e a podridão branca. Na podridão castanha, o substrato remanescente apresenta-se quebradiço, com tonalidade escura e forma cúbica. Isto acontece devido ao fato destes fungos degradarem preferencialmente a celulose, ficando o resíduo remanescente enriquecido em lignina. A madeira, quando é atacada por fungos promotores da podridão branca, apresenta uma textura fibrosa, coloração clara e não existe fratura cúbica (Fig. 5) (BORTOLAZZO, 2011).

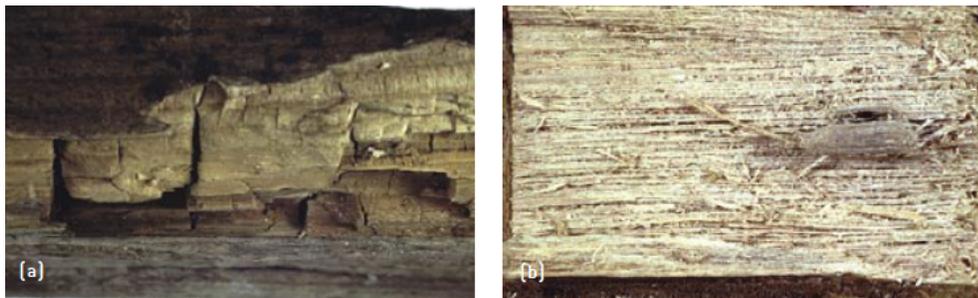


Fig. 5. (a) Podridão castanha (*Coniophora puteana*) (b) Podridão branca (*Phellinus contiguus*) (PALA, 2007).

Os fungos secretam grande diversidade de enzimas no ambiente que são utilizadas para auxiliar na sua nutrição, desta maneira são responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais, refinados ou processados. Nas últimas décadas, a utilização dos fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de biorremediação vêm crescendo em virtude do alto potencial degradativo, biossortivo (metais pesados e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas (CONCEIÇÃO et al., 2005).

Entre os sistemas degradativos estão relativamente bem descritas algumas enzimas que podem atuar sobre os componentes de forma isolada. Como exemplo, podem ser mencionadas as celulasas, que são divididas em endo-1,4- β -glicanases (hidrolisam ligações glicosídicas ao acaso, gerando oligômeros) e celobio-hidrolases (hidrolisam os oligômeros gerados pelas endo-1,4- β -glicanases, liberando moléculas de celobiose). Um grupo finalizador da hidrólise é composto pelas 1,4- β -glicosidases, que

hidrolisam a celobiose a glicose. Ainda dentro do complexo celulolítico há a celobiose-desidrogenase que oxida vários açúcares como celobiose, lactose, oligômeros de glicose e, inclusive, a celulose (AGUIAR & FERRAZ, 2011).

A biodegradação de polioses envolve a ação de enzimas frequentemente classificadas de acordo com os distintos substratos. O sistema hemicelulolítico requerido para a hidrólise da hemicelulose é mais complexo que o sistema celulolítico, já que a hemicelulose apresenta natureza heterogênea. As xilanases rompem ligações entre unidades monoméricas de xilose, enquanto as mananases atuam sobre ligações entre moléculas de manose, respectivamente. A β -xilosidase e a β -manosidase hidrolisam dímeros de xilose e manose, respectivamente. Outras enzimas importantes são as α -glicuronidases e acetil-esterases, que atuam sobre ligações de ácidos urônicos e grupos acetila com moléculas de açúcares, respectivamente (CANILHA et al., 2009).

Um vasto grupo de enzimas está relacionado à biodegradação da lignina. No entanto, até os dias de hoje, existem inúmeras dúvidas sobre a real participação de cada grupo e a função que cada um deles exerce no processo global de oxidação que leva a lignina até dióxido de carbono e água. De forma geral, é possível classificar as enzimas envolvidas na degradação de lignina em pelo menos dois subgrupos: um contém as enzimas dependentes de peróxido: lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) e o outro subgrupo contém enzimas que são cuproproteínas e independentes de peróxido para atuarem, as lacases (FREITAS, 2008).

Em termos gerais, as enzimas do complexo ligninolítico podem ser ordenadas segundo suas capacidades oxidativas: LiPs > MnPs > Lacases. Estas enzimas são comumente produzidas por fungos causadores de podridão branca; no entanto, existem algumas espécies que são eficientes na degradação de lignina, mas que produzem somente uma, duas ou as três enzimas simultaneamente. Já os fungos causadores de podridão parda são conhecidos como não produtores de fenoloxidasas (BORTOLAZZO, 2011).

As LiPs podem abstrair elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas, dando origem a radicais cátion. As MnPs são dependentes de Mn^{2+} e são capazes de abstrair elétrons apenas de estruturas fenólicas. A Figura 6 mostra os ciclos catalíticos simplificados dessas duas enzimas (AGUIAR & FERRAZ, 2011).

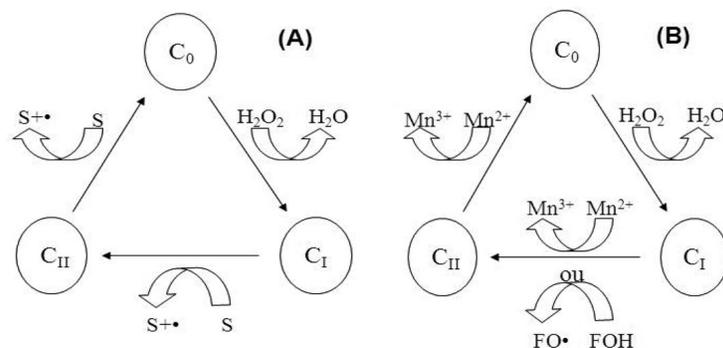


Fig. 6. Ciclo catalítico simplificado da LiP (A) e MnP (B); S = substrato aromático, FOH = substrato fenólico (AGUIAR & FERRAZ, 2011).

Nos dois casos, a enzima é ativada pela oxidação por H₂O₂, levando à formação do composto I (C_I) que é um oxocomplexo deficiente em 2 elétrons. A redução do C_I até a enzima nativa ocorre por meio de duas etapas, com a abstração de 1 elétron de cada vez. No caso das LiPs, a redução de C_I a C_{II} e também de C_{II} a C₀ pode ocorrer por meio da oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos levando à formação de radicais cátion (Fig. 6A). Por outro lado, as MnPs dependem de Mn²⁺ para a redução de C_{II} a C₀ (Fig. 6B). O composto I pode ser reduzido ao composto II à custa da oxidação direta de uma estrutura fenólica ou de um átomo de Mn²⁺, mas o íon Mn²⁺ parece o elo preferencial de transferência de elétrons. O Mn³⁺ formado é bastante reativo, podendo atuar como um mediador da MnP e é normalmente estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico. O complexo Mn³⁺-oxalato, por sua vez, pode ser reduzido à custa da oxidação de outra estrutura fenólica (AGUIAR & FERRAZ, 2011).

As lacases atuam pela abstração de um elétron de fenóis, em função da redução de Cu²⁺ a Cu¹⁺ que, por sua vez, reduz O₂ a H₂O, permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Fig. 7). A estequiometria do ciclo envolve 4 Cu¹⁺ (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de O₂. Entretanto, estas enzimas também podem degradar estruturas aromáticas não fenólicas por meio da oxidação de alguns mediadores sintéticos como o hidroxibenzotriazol (HBT) ou mesmo naturais, como derivados do ácido benzoico e íons Mn²⁺ (BORTOLAZZO, 2011; AGUIAR & FERRAZ, 2011).

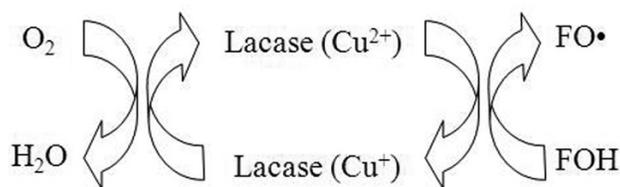


Fig. 7. Ciclo catalítico das lacases; FOH = substrato fenólico (AGUIAR & FERRAZ, 2011).

BIOCOMBUSTÍVEIS

A energia pode ser considerada como algo essencial para a vida humana, seja para iluminação, indústrias, veículos, etc. Dentre as formas de obtenção de energia estão os combustíveis, principalmente os combustíveis de origem fóssil, sendo que o consumo de energia mundial utilizando esta fonte supera os 50% (ANEEL, 2008).

Os combustíveis fósseis causam problemas ambientais, como o aquecimento global, poluição de rios e oceanos, além de ser um alarme a sua escassez para as próximas décadas, se fazendo necessária, portanto, a busca por maneiras alternativas de produção de combustíveis. Algumas destas já estão bem estabelecidas, como, por exemplo, o gás natural e o etanol, que são menos poluentes e consideradas fontes renováveis de carbono. O etanol perfaz 40% do mercado de combustíveis de veículos leves no Brasil, e esse valor tende a aumentar devido à crescente busca por formas sustentáveis de energia (MACEDO, 2007). O etanol ou bioetanol é o álcool etílico (C_2H_5OH) produzido através da fermentação dos açúcares encontrados em produtos vegetais (BASTOS, 2007).

O Brasil é o maior produtor do mundo de cana, matéria-prima utilizada na produção do etanol, porém, existem outras fontes para a produção deste biocombustível, como etanol de milho (EUA), etanol de beterraba (Alemanha), etanol de sorgo sacarino (África), etanol de trigo (Europa), etanol de mandioca (MACEDO, 2007).

Para a produção de bioetanol é necessária uma sequência de eventos. A produção de etanol a partir de cana-de-açúcar inicia com a moagem da cana, que libera o subproduto conhecido como “garapa”, com grande concentração de sacarose; segue a produção do melaço, com aquecimento e adição de fermentos biológicos (bactérias: *Zymomonas mobilis*, *Erwinia amylovora*, *Spirocaheta litoralis*, *Thermanaerobacter ethanolicus* e leveduras: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ellipsoideus*,

Schizosaccharomyces pombe), que serão responsáveis pela transformação do açúcar em etanol. A etapa final consiste em uma destilação fracionada (SILVA, 2010).

A agroindústria é grande fornecedora de biomassa não aproveitada, sendo responsável por grande parcela dos chamados rejeitos industriais. Esta elevada disponibilidade de fibras lignocelulósicas abre uma grande oportunidade para avanços tecnológicos que agreguem valores aos produtos da agroindústria. Bastos (2007) aponta a utilização da biomassa lignocelulósica como um novo conceito na produção de álcool, também chamado de etanol de segunda geração, pois no seu processamento são utilizados resíduos de produtos naturais, principalmente proveniente da agroindústria (bagaço de cana, sabugo de milho, casca de arroz, palha de trigo, entre outros). Além disso, a produção de álcool a partir dos resíduos lignocelulósicos tem sido considerada, em escala mundial, como uma forma viável para a produção de um combustível que substituiria os combustíveis derivados de petróleo (ALVIRA et al., 2010; SOCCOL et al., 2011).

Porém, esse modo de produção de álcool enfrenta problemas. O principal deles é a remoção dos açúcares fermentáveis da estrutura da fibra, devido à lignina, molécula altamente recalcitrante e de difícil degradação, que prejudica também a degradação química ou enzimática da celulose (HIMMEL et al., 2007).

Assim, degradar a lignina tem sido uma etapa limitante na produção de álcool de segunda geração. Vários tipos de pré-tratamento da fibra têm sido propostos: químicos - tratamentos ácidos (GUPTA et al., 2009) e tratamentos alcalinos (CARILLO et al., 2005); físicos - explosão a vapor (OHGREN et al., 2006) e pré-tratamentos biológicos (CARDONA et al., 2010; SHRESTHA et al., 2008). Os tratamentos físico-químicos utilizados nas fibras muitas vezes são prejudiciais ao meio ambiente, por este motivo, tratamentos mais brandos são desejáveis, entre estes, destacam-se os biológicos, pois causam pouca ou nenhuma poluição ao ambiente (CANILHA et al., 2009).

No que diz respeito ao pré-tratamento biológico das fibras lignocelulósicas, um dos possíveis processos para a degradação da lignina e posterior sacarificação é a utilização dos fungos da podridão branca, que, como já foi mencionado, possuem um arsenal de enzimas com capacidade ligninolítica: lacases e peroxidases. Estas enzimas atuam sobre a lignina degradando-a, facilitando assim a atividade da celulase nas fibras (CONCEIÇÃO et al., 2005). Assim, os açúcares liberados após o pré-tratamento, seguido da sacarificação com celulases, podem ser utilizados para várias finalidades, dentre elas a produção de etanol de segunda geração (CASTRO, 2010).

OBJETIVOS DO MINICURSO

- Selecionar isolados de basidiomicetos quanto à produção de enzimas extracelulares (lacase, celulase e xilanase);
- Acompanhar o crescimento de três espécies dos isolados de basidiomicetos em diversos resíduos agroindustriais (farelo de trigo, bagaço de milho, sabugo de milho, bagaço de laranja, casca de maracujá e bagaço de cana);
- Analisar enzimas extracelulares (lacase, xilanase e celulase) nos extratos brutos de cultivos selecionados;
- Desenvolver tratamentos biológico e enzimático em biomassa lignocelulósica visando à liberação de açúcares fermentáveis;
- Quantificar os açúcares redutores a partir dos tratamentos realizados na biomassa lignocelulósica;
- Relacionar o crescimento dos basidiomicetos na biomassa lignocelulósica com a liberação de açúcares fermentáveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Avaliação do potencial enzimático – seleção de isolados

A avaliação da capacidade de produção de fenoloxidasas (lacase) e de enzimas hidrolíticas (xilanase e celulase) por isolados de basidiomicetos será realizada em meio agar sólido em placas de Petri através da visualização de halos em meios específicos compostos por:

(a) Guaiacol a 0,2%, farelo de trigo a 0,01% e agar a 1,8% (lacase) (OKINO et al., 2000),

(b) RBBxylan a 0,05%, extrato de levedura a 0,67% e agar a 1,8% (xilanase) (BASARAN et al., 2000) e

(c) Carboximetilcelulose a 0,2%, peptona a 0,02%, NaNO₃ a 0,2%, K₂HPO₄ a 0,1%, MgSO₄ a 0,05%, KCl a 0,05% (celulase). A solução para revelação do halo neste teste será preparada com iodo a 1% e iodeto de potássio a 2% (KASANA et al., 2008).

Os isolados usados para o experimento serão: *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* CCB01, *P. pulmonarius* CCB19, *P. pulmonarius* CCB20, *Trametes* sp. e *Lentinus edodes*.

2- Cultivos de basidiomicetos em diferentes resíduos lignocelulósicos

Três isolados de basidiomicetos selecionados quanto à produção de enzimas através do teste em placas serão cultivados em seis resíduos agroindustriais (farelo de trigo, casca de maracujá, bagaço de cana, bagaço de milho, bagaço de laranja e sabugo de milho) por meio de fermentação no estado sólido.

Para os cultivos, 4 g de cada resíduo serão adicionados em frascos Erlenmeyers de 125 ml. Os substratos serão umedecidos com meio mineral de Vogel (1959) para atingir umidade inicial de 80%. Cada frasco será inoculado com três discos de agar-batata-dextrose completamente colonizados com micélio. Os cultivos ficarão em estufa a 28°C, no escuro e sem agitação por 10 dias, quando, então, serão interrompidos com a adição de 20 ml de água destilada, homogeneização e agitação por 20 minutos a 8°C. O conteúdo líquido de cada frasco será filtrado, com a utilização de gaze e funil, e o filtrado obtido – extrato enzimático bruto - será centrifugado e congelado para posteriores análises enzimáticas. Cultivos abióticos serão realizados para controle.

3- Análises enzimáticas

As enzimas lacase e celulase serão determinadas nos extratos brutos obtidos do experimento anterior.

- 1) **Lacase:** A atividade da lacase será determinada a 40°C usando o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) como substrato. A mistura de reação conterá 200 µl de ABTS (10 mM), 100 µl do filtrado em 1,7 ml de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,0 ou 5,0). O aumento da absorvância será monitorado a 420 nm (PELÁEZ et al., 1995).
- 2) **Celulase e Xilanase:** As atividades de celulase e xilanase serão determinadas a 40°C utilizando-se os substratos carboximetilcelulose e xilano, respectivamente, a 1%, pela liberação de açúcares redutores, utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

4- Tratamentos biológico e enzimático da biomassa lignocelulósica para obtenção de açúcares fermentáveis

O tratamento biológico sobre a biomassa lignocelulósica com fungo da podridão branca da madeira se desenvolverá com o crescimento de um basidiomiceto selecionado, a partir dos experimentos anteriores, em cultivos similares aos supracitados no item 2 da metodologia. Os inóculos consistirão em quatro discos de agar-batata-dextrose colonizados com micélio. Os cultivos serão realizados em frascos Erlenmeyers de 250 ml contendo 10 g do material lignocelulósico escolhido dentre os seis resíduos testados, adicionados de glicose, extrato de levedura e solução mineral de Vogel (1959). A umidade inicial dos cultivos será de 80% e os mesmos serão mantidos em estufa a 28°C por 30 dias.

Após o tratamento da biomassa com o fungo, a mesma será submetida ao tratamento com a enzima celulase comercial (Sigma C8546), para ocorrer a degradação dos polímeros da celulose do meio em açúcares fermentáveis. Após os 30 dias de cultivo, a biomassa lignocelulósica será homogeneizada e seca a 50°C até peso constante e em seguida triturada (60 mesh). O tratamento enzimático será realizado com 5% da biomassa devidamente seca e triturada em tampão citrato de sódio (pH 5,0), a 37°C, durante 48 horas, agitação de 150 rpm, com 5 U/ml de celulase (SILVA et al., 2011). Durante o tratamento, serão retiradas alíquotas para análises de açúcares redutores, que serão determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. *Quim. Nova*, 34: 1729-1738, 2011.

AKHTAR, M.; BLANCHETTE, R. A.; MYERS, G.; KIRK, K. Em *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*; Young, R.; Akhtar, M., eds.; Wiley and Sons: New York, 1998, cap. 10.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pre-treatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresour. Technol.*, 101: 4851-4861, 2010.

ANEEL. **Boletim Energia**. Energia no Brasil e no Mundo: Consumo, 2008. Disponível em: http://www.aneel.gov.br/arquivos/PDF/atlas_par1_cap2.pdf. Acesso em: 23 de abril de 2012.

BASARAN, P.; BASARAN, N.; HANG, Y. D. Isolation and characterization of *Pichia stipitis* mutants with enhanced xylanase activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 545-550, 2000.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. *BNDES Setorial*, 25: 5-38, 2007.

BOERJAN, W.; VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, 153: 895-905, 2010.

BORTOLAZZO, N.G. *Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço-de-cana de açúcar*. 77 f. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2011.

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.;

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresour. Technol.*, 101: 4754-4766, 2010.

CARRILLO, F.; LIS, M. J.; COLOM, X.; LÓPEZ-MESAS, M.; VALLDEPERAS, J. Effect of alkali pretreatment on cellulose hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. *Process Biochem.*, 40: 3360-3364, 2005.

CASTRO, A. L. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*, 33: 181-188, 2010.

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arq. Inst. Biol.*, 72: 99-106, 2005.

DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 597-606, 2006.

FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood Chemistry: Ultrastructure and Reactions*, 1° ed., Walter de Gruyter: Berlin, 1989.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Braz. J. Microbiol.*, 37: 474-480, 2006.

GUPTA, R.; MEHTA, G.; KHSA, Y. P.; KUHAD, R. C. Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of cellulose. *Biodegradation*, 22: 797-804, 2011.

HENRIKSSON, G.; LENNHOLM, H. *Pulp and Paper Chemistry and Technology*. Ek, M.; Gellerstedt, G.; Henriksson, G., eds.; De Gruyter: Stoclm, vol. 1, cap. 4., 2009.

HIMMEL, M. E.; DING, S. -Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W.; et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315: 804-807, 2007.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Curr. Microbiol.*, 57: 503-507, 2008.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 57: 45-125, 1997.

MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. *Estudos avançados*. 21: 157-165, 2007.

MATTHEWS, J. F.; SKOPEC, C. E.; MASON, P. E.; ZUCCATO, P.; TORGET, R. W.; SUGIYAMA, J. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose Iβ. *Carbohydr. Res.*, 341: 138-152, 2006.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428, 1959.

OHGREN, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *J. Biotechnol.*, 126: 488-498, 2006.

OKINO, L. K.; MACHADO, K. M. G.; FABRIS, C.; BONONI, V. L. R. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16: 889-893, 2000.

PALA, H. Constituição e mecanismos de degradação biológica de um material orgânico: a madeira. *Construção Magazine*, 20: 54-62, 2007.

PELÁEZ, F.; MARTÍNEZ, M. J.; MARTÍNEZ, A. T. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol. Res.*, 99: 37-42, 1995.

RALPH, J.; LUNDQUIST, K.; BRUNOW, G.; LU, F.; KIM, H.; SCHATZ, P. F.; MARITA, J. M.; HATFIELD, R. D.; RALPH, S. A.; CHRISTENSEN, J. H.; BOERJAN, W.; Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Review*, 3: 29-60, 2004.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quim. Nova*, 26: 863-871, 2003.

ROCHA, G. J. M.; et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. *Analytica*, 44: 48-91, 2009.

SHRESTHA, P.; RASMUSSEN, M.; KHANAL, S. K.; POMETTO, A. L.; VAN LEEUWEN, J. Solid-substrate fermentation of corn fiber by *Phanerochaete chrysosporium* and subsequent fermentation of hydrolysate into ethanol. *J. Agric. Food Chem.* 56: 3918-3924, 2008.

SILVA, A. S.; LEE, S.; ENDO, T.; BON, E. P. S. Major improvement in the rate and yield of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse via pretreatment with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim] [Ac]). *Bioresour. Technol.*, 102: 10505-10509, 2011.

SJÖSTRÖM, E. *Wood chemistry: Fundamentals and applications*, 2ª ed., Boca Ranton: Academic Press, p. 269, 1992.

SMITH, J. E.; ANDERSON, J. G.; SENIOR, E. K. Bioprocessing of lignocelluloses. *Phil. Trans. Royal Society*, 321:507-521, 1987.

SOCCOL, C. R. et al. Lignocellulosic bioethanol: current status and future perspectives. *Biofuels*, 101-122, 2011.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbiol. Genet. Bull.*, 13: 42-47, 1956.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65: 497-522, 2001.

COMPOSIÇÃO FENÓLICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE RESÍDUOS DE FRUTAS

Dra. Cristina Giatti Marques de Souza
Dra. Rosane Marina Peralta
Andréia Assunção Soares
Gisele Teixeira de Souza Sora
Simone Mariano da Silva

INTRODUÇÃO

A agroindústria tem se expandido cada vez mais para atender a crescente demanda populacional por alimentos. Dentro desse contexto, o Brasil, com sua economia fortemente baseada no agronegócio, contribui para a geração de grande quantidade de resíduos agroindustriais resultantes das atividades de processamento (ALBUQUERQUE, 2009).

Esses resíduos, em muitas situações, representam um grave problema, pois, aparentemente sem aplicação viável são descartados diretamente no ambiente (ALBUQUERQUE, 2009).

Os alimentos não aproveitados ao longo da cadeia produtiva representam 1,4% do Produto Interno Bruto (PIB), o que ultrapassa a quantia de R\$ 17,25 bilhões de reais. Aproximadamente 64% do que se planta no Brasil é perdido ao longo dessa cadeia, sendo: 20% na colheita, 8% no transporte e armazenamento, 15% na indústria de processamento, 1% no varejo e 20% no processamento culinário e hábitos alimentares (BANCO DE ALIMENTOS, 2006).

Os resíduos agroindustriais são constituídos pelos restos de plantas não aproveitados comercialmente ou condicionados pela maturidade da cultura ou oferta da matéria-prima (MATOS, 2005).

A indústria alimentícia, que até então não demonstrava maior preocupação com o reaproveitamento de resíduos, vem se mostrando aberta ao diálogo para empregar os resultados das novas pesquisas nas etapas produtivas, uma vez que estão verificando a real possibilidade de agregar valor ao seu negócio (ALENCAR, 2009).

De acordo com Alencar (2009), do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da USP, muitos resíduos são ricos em compostos bioativos, amplamente

reconhecidos pelas suas propriedades promotoras de saúde e aplicações tecnológicas, tais como antioxidantes e antimicrobianos, representando, portanto, potenciais fontes naturais destas substâncias.

O estudo desses compostos bioativos de alimentos inspirou o conceito de alimentos funcionais. Compostos bioativos são constituintes extranutricionais e ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos, o interesse neles cresce a cada ano (ALENCAR, 2009).

Estudos epidemiológicos, que abordam principalmente uma dieta rica em alimentos de origem vegetal, apresentam resultados interessantes, sugerindo que esses alimentos são capazes de exercer influência na redução do risco do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como cardiovasculares, cânceres, distúrbios metabólicos, doenças neurodegenerativas e enfermidades inflamatórias (CARRATU e SANZINI, 2005).

Os compostos fenólicos compõem um grupo de compostos secundários ou aleloquímicos. Do ponto de vista estrutural, pode-se definir composto fenólico como uma substância que possui uma hidroxila ligada a um anel aromático. As plantas produzem diferentes grupos quimicamente heterogêneos desses compostos que, de acordo com sua diversidade química, desempenham inúmeras funções (TAIZ & ZIEGER, 2002).

De acordo com Soares (2002) os compostos fenólicos encontrados em muitas plantas possuem propriedades antioxidantes e alguns estudos avaliaram seu potencial antioxidante tanto na conservação de alimentos lipídicos quanto nos organismos.

Esses compostos englobam uma gama enorme de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas) que são na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativas e suscetíveis à ação de enzimas. Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados em todo o reino vegetal. Estes fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: ácidos fenólicos e flavonóides (SOARES, 2002).

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos: 1- ácidos benzóicos (C_6-C_1), são os mais simples encontrados na natureza como por exemplo, ácido salicílico, ácido gálico, ácido vanílico entre outros; 2 - ácidos cinâmicos (C_6-C_3), exemplo, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido o-cumárico entre outros; 3 - cumarinas que são derivadas

do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (SOARES, 2002).

Os flavonóides possuem uma estrutura básica formada por C₆-C₃-C₆, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as flavonas, flavonóis, antocianinas, isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (SOARES, 2002).

Deste modo, um grande número de efeitos farmacológico e biológico é atribuído aos flavonóides. A relação entre atividades biológicas e estrutura química de flavonóides em vários sistemas também tem sido extensivamente revisada (RICE-EVANS, 1996).

Os compostos fenólicos mais estudados são: o ácido caféico, o ácido gálico e o elágico. Esses compostos são importantes na dieta alimentar para a diminuição da peroxidação lipídica (Halliwell et al., 1995). Os flavonóides miricetina, quercetina e rutina foram mais efetivos do que a vitamina C na inibição dos danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio - H₂O₂ no DNA de linfócitos humanos (NOOROZI *et al.*, 1998).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcóxila e peróxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SOARES, 2002).

2 – METODOLOGIA

2.1 Materiais

Serão utilizados extratos de resíduos da casca e sementes de uva tinta derivados do processamento de suco de uva integral e extrato de suco de uva tinta integral.

2.2. Extração dos Compostos Fenólicos

Extração etanólica (40%). Será utilizada uma curva padrão de ácido gálico (Figura 1) para a quantificação dos fenóis. Os resultados serão expressos em mg de ácido gálico por 100 g⁻¹ de amostra.

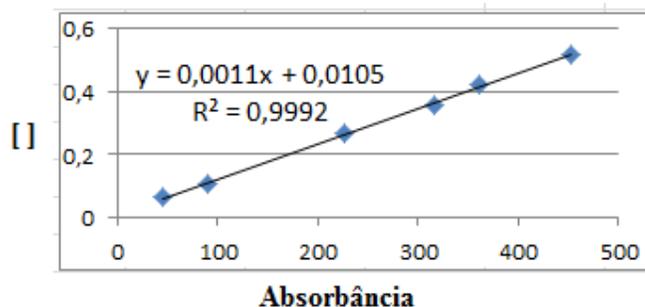


Figura 1 – Curva padrão de ácido gálico (concentração x absorbância).

- Pesar 5g de amostra;
- Adicionar 20 mL de solução hidroalcoólica (40%);
- Submeter solução a agitação constante à temperatura ambiente por uma hora;

OBS: se necessário realizar a diluição das amostras.

2.3. Determinação de Compostos Fenólicos por Folin-Ciocalteu's phenol

Metodologia de Singleton e Rossi (1965), adaptada por Daves (2003). A absorbância deve ser medida em 765 nm.

- Pipetar 30 µL de extrato das amostras diluídas adequadamente em um tubo de ensaio;
- Pipetar 2,370 µL de água destilada e acrescentar ao tubo;
- Pipetar 150 µL do reagente Folin-Ciocalteu.

Após um período de dois minutos, adiciona-se 450 µL de carbonato de sódio a 15%. Agitam-se os tubos e acondiciona-os no escuro, à temperatura ambiente por duas horas.

2.4. Atividade Quelante do Íon Ferroso

(SENEVIRATHNE et al., 2006 – Food Sci Tech Int. 12-1, 27-38; KUDA et al., 2005 – J. of Food Comp. and Analysis. 18, 625-633; DECKER and WELCH, 1990 – J. Agric. Food Chem. 38, 674-677)

✓ Em cada tubo de ensaio, colocar:

0,7 mL de amostra (extrato) - diluído ou não

0,7 mL de água Dest.- Controle

0,7 mL de EDTA - 0,5 mM - Controle Positivo

*Fazer sempre em duplicata o controle e as amostras

Após, adicionar:

+ 0,7 mL de água destilada.

+ 175 µL de Cloreto Ferroso (FeCl₂) - 0,5 mM.

Medir A_{550 nm} (Abs 1)

Após a leitura Abs1, adicionar nos tubos:

+ 175 µL de Ferrozine - 2,5 mM.

Esperar 20 min a Temperatura Ambiente

Medir A_{550 nm} (Abs 2)

* Branco - H₂O Dest. para “zerar”

* Controle - H₂O Dest.

* EDTA - 0,5mM foi usado como Controle Positivo

Obs:

Fe⁺⁺ combina-se com a Ferrozine - apresentando uma coloração roxa

EDTA é um quelante potente - a amostra fica incolor

Controle - H₂O Dest. apresenta uma intensa coloração roxa

A atividade é dada como:

Atividade quelante do íon ferroso (%) = [(1 - (A2 am - A1 am)/(A2 cont - A1 cont)) x 100]

2.5. Determinação de Flavonóides Totais

(ALOTHMAN, BHAT & KARIM, 2009, FOOD CHEMISTRY, 115, 785-788)

✓ Em cada tubo de ensaio, colocar:

250 µL de amostra diluída adequadamente ou de cada padrão (No branco colocar água)

1000 µL água destilada

75 µL NaNO₂ 5% em água

✓ Após 5 min, adicionar:

75 µL AlCl₃ 10% em água

✓ Após 6 min, colocar:

500 µL NaOH [1M]

Adicionar 600 µL de água destilada,

Agitar vigorosamente (vórtex) e Ler imediatamente a A_{510 nm}

Catequina utilizada como Padrão (Figura 2)

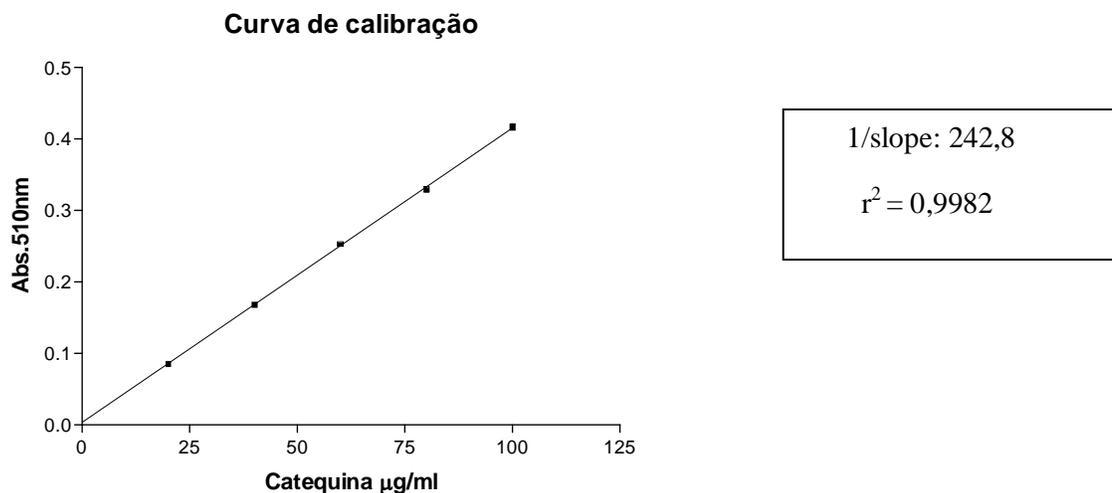


Figura 2 – Catequina - Padrão

2.6. Ensaio DPPH - atividade antioxidante

O método DPPH consiste na redução do radical DPPH de coloração púrpura, que, ao receber um elétron ou um radical hidrogênio, muda sua coloração de violeta para amarelo (difetil-piricril-hidrazina) (Figura 3), ficando estável e com o desaparecimento da absorção que pode ser avaliada pelo decréscimo da absorbância (ROGINSKY e LISSI, 2005).



Figura 3 – Redução do radical DPPH para amarelo.

A eficácia anti radical foi avaliada com o método DPPH, como descrito por Mensor *et al.* (2001).

Com base em valores de compostos fenólicos totais (Folin-cicalteu), seis diferentes concentrações (5, 10, 25, 50, 125 e 250 ppm, em etanol), do extrato serão utilizados para realizar o DPPH . Os valores de EC_{50} serão calculados por regressão linear de parcelas onde a abscissa representa a concentração de extratos vegetais testados e ordenada a porcentagem média de atividade antioxidante de três ensaios separados (Sim & Sil, 2008). BHT será utilizado como padrão na concentração de 100 ppm.

Para preparar DPPH a 0,3mmol/L

Diluir 0,012g de DPPH em 100mL de metanol (balão volumétrico)

PREPARO DAS AMOSTRAS:

- 1) **AMOSTRA:** 2,5mL de extrato de amostra + 1mL de solução DPPH;
- 2) **BRANCO:** 2,5mL de extrato de amostra + 1mL do mesmo solvente utilizado na extração (cada amostra e diluição terão seu branco para ser utilizado na esquadração final).
- 3) **CONTROLE (-):** 2,5mL do mesmo solvente utilizado na extração+ 1mL de solução DPPH;
- 4) **CONTROLE (+):** 2,5mL do padrão (BHT à 100ppm) + 1mL de solução de DPPH;

Após o preparo das amostras, deixa-las sobre a ausência da luz, armazenadas por 30 minutos, passado o tempo da reação medir a absorbância em espectrofotômetro a 518

nm a qual será convertida em porcentagem da atividade antioxidante (% AA) utilizando a seguinte equação

Cálculo de Porcentagem da Atividade Antioxidante

$$AA\% = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right]$$

sendo: $Abs_{amostra}$ é a absorbância da amostra, Abs_{branco} é a absorbância do controle em branco e $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle negativo.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, C., *Aproveitamento de resíduos traz ganhos econômicos e ambientais*. Assessoria de Comunicação da Esalq, USP-Universidade de São Paulo SP, 2009.
- ALENCAR, S. M. *Esalq desenvolve pesquisa para reduzir resíduos da agroindústria*, Agrosoft, Universidade Estadual de São Paulo – USP, São Paulo SP, Brasil, 2009.
- ALOTHMAN, M., BHAT, R., KARIN, A. A. (2009). *Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents*. Food Chemistry. 115:785-789.
- BANCO DE ALIMENTOS – *Dados da Fome*, 2006, Copyright, Disponível em: <<http://www.bancodealimentos.org.br>>.
- CARRATU, E., SANZINI, E., *Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale*. Ann. Ist. Super Sanità, 41 ed., vol.1, p.7-16, 2005.
- CHOI, Y., LEE, S. M., CHUN, J., LEE, H. B., & LEE, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. Food Chemistry, 99, 381-387.
- DAVES, J. W. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Copyright by John Wiley & Sons Inc, p. 1073-1080. California, 2003.
- MATOS A. T., *Curso Sobre Tratamento de Resíduos Agroindustriais* - Fundação Estadual do Meio Ambiente, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.
- MENSOR, L. L., MENEZES, F.S., LEITÃO, G.G., REIS, A.S., dos SANTOS T.C., COUBE, C.S., LEITÃO, S. G. *Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method*. Phytother Res. v.15 p.127-130, 2001.
- ROGINSKY, V. e LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry, v. 92, p. 235-254, 2005
- SIM, K.H. e SIL, H.Y. *Antioxidant activities of red pepper (Capsicum annuum) pericarp and seed extracts*. International journal of food and science technology v. 43, n°. 10, p. 1813-1823, 2008.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, v.16, p.144–158, 1965.
- THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., & BYRNE, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis, 19, 669-675.
- TURKOGLU, A., DURU, E. M., MERCAN, I. K., GEZER, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Food Chemistry, 101: 267-273.

TÉCNICA DE WESTERN BLOT APLICADAS AO ESTUDO DE METABOLISMO

Dr. Roberto Barbosa Bazotte
Any de Castro Ruiz Marques
Fabiana P. Monteiro Schiavon
Helenton Cristhian Barrena
Márcia Aparecida Carrara
Marcio Guilhermetti
Vania Cibele M. Câmara

INTRODUÇÃO

1. “Western blotting”

“Western blotting” (WB), também conhecido como “imunoblotting”, é uma técnica usada para a detecção e análise de proteínas. A amostra pode ser uma mistura de proteínas complexas como um extrato de tecido ou células, mas pode também ser uma amostra de proteína purificada. A amostra de interesse é usualmente submetida a tratamento preliminar antes de ser separada pela eletroforese.

Após preparo, a amostra é aplicada ao gel de eletroforese para separação das proteínas, e após, as mesmas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, polifluoreto de vinilideno (PVDF) ou nylon à qual ficarão ligadas. Após bloqueio da superfície remanescente da membrana prevenindo ligações não específicas dos anticorpos, a membrana é incubada com o anticorpo primário que especificamente liga-se à proteína de interesse. Os anticorpos não ligados são removidos por lavagem. Os complexos antígeno-anticorpo são depois reconhecidos por anticorpos secundários (assim designados por ligarem-se aos anticorpos primários). A detecção destes complexos é possível, devido aos anticorpos secundários serem conjugados com enzimas, como a fosfatase alcalina ou peroxidase rábano silvestre (*horseradish*), que utilizam substratos cromogênicos ou luminescentes.

Apesar de os detalhes do protocolo de WB poderem variar de aplicação a aplicação, com adaptações de acordo com características específicas da proteína em estudo, todos seguem alguns passos básicos:

1. Preparação da amostra
2. Eletroforese em gel
3. Transferência
4. Bloqueio de sítios inespecíficos

5. Ligação dos anticorpos
6. Detecção

1.1 Preparo da amostra

Em princípio, toda fonte de proteína, de simples células ao tecido todo, como matrizes extracelulares, fluidos biológicos e proteínas secretadas *in vitro*, estão abertas à análise por WB. Enquanto fontes como células de mamíferos em suspensão são facilmente rompidas sob condições suaves e prontamente liberam suas proteínas, é mais difícil extrair proteínas de células embebidas profundamente em tecidos intactos como dentro de tumores sólidos. Extração de proteínas de plantas, bactérias e fungos são também complicadas pela presença da parede celular rígida e rica em carboidrato que rodeia e protege a célula viva.

Independente da fonte e da proteína de interesse, o principal deve ser a escolha de um procedimento de extração agressivo o suficiente para acessar e romper a célula sem alterar irreversivelmente as proteínas em estudo, e ao mesmo tempo, obter suficiente produção de material a um aceitável nível de pureza. Deve-se usar um procedimento de extração que seja tão suave quanto possível, pois ruptura vigorosa do tecido ou célula pode desnaturar diretamente a molécula de interesse, formar complexos proteicos permanentes, causar modificações químicas, ou levar à liberação de enzimas proteolíticas compartimentalizadas. Em geral, métodos suaves são empregados quando a amostra consiste em células cultivadas que são lisadas facilmente ou células sanguíneas, enquanto métodos vigorosos são empregados para a ruptura de células de plantas ou bactérias, ou células de mamíferos embebidas em tecido conectivo.

É importante extrair as proteínas lentamente, sob refrigeração (banho de gelo) e na presença de um tampão para manter o pH, força iônica e a estabilidade prevenindo a degradação proteica. A proteína alvo é uma entre muitas milhares presentes na amostra, além de ácidos nucleicos, polissacarídeos, e lipídeos, que podem interferir na análise. Às vezes pode ser útil isolar a proteína específica da amostra usando técnicas como a **imunoprecipitação**, principalmente para detectar pequenas quantidades de proteínas. Por outro lado, a análise de proteínas em abundância pode ser realizada satisfatoriamente usando amostras nativas. A escolha do método de extração depende primariamente da amostra e se a análise é em toda a célula ou somente em um

componente de uma fração subcelular particular. Algumas opções de extração de proteínas são:

1.1.1 Lise baseada em detergente: É o mais frequente dos métodos de escolha para o tratamento de células de mamíferos. A suspensão de células é gentilmente centrifugada e ressuspensa em solução de lise contendo detergente. As membranas são solubilizadas liberando seus conteúdos.

1.1.2 Lise por congelamento/descongelamento: Este método é aplicável para suspensão de células bacterianas ou de mamíferos. É um método simples e de baixo custo. As células são destruídas por repetida formação de cristais de gelo. O método é usualmente combinado com lise enzimática. As células em suspensão são rapidamente congeladas no nitrogênio líquido, descongeladas, ressuspensas por pipetagem em tampão de lise a temperatura ambiente e o processo é repetido por várias vezes. Entre os ciclos a amostra é centrifugada e o sobrenadante descartado.

1.1.3 Choque osmótico: É um dos métodos menos agressivos, sendo suficiente para a lise de suspensão de células de mamíferos ou bacterianas sem o uso de detergente. O método, frequentemente combinado com ruptura mecânica, baseia-se na mudança do meio de maior osmolaridade para o de menor osmolaridade e é bem adequado para aplicação na qual o lisado será subsequentemente fracionado em componentes subcelulares.

1.1.4 Ultrasonicação: É frequentemente utilizado em suspensão de células. As células são rompidas por maior frequência de ondas sonoras (20 a 50 KHz) via uma sonda inserida na amostra, causando a ruptura da membrana das células próximas à ponta da sonda. As suspensões de células devem ser sonicadas em curtos períodos para evitar aquecimento da amostra, e as amostras devem ser resfriadas entre os períodos. Este protocolo é útil para preparação de amostra em pequena escala. Apesar de simples, a ultrasonicação é um método vigoroso de preparação. A liberação do DNA pode levar a uma viscosidade maior da amostra que dificulta o processamento. A viscosidade pode ser diminuída pela adição de DNase.

1.1.5 Método mecânico: As proteínas podem ser extraídas das células e tecidos usando um sistema de moagem. Por exemplo, células podem ser rompidas passando através de uma abertura estreita. Isso pode ser alcançado manualmente ou usando o Polytron. O Polytron atrai o tecido para o local que contém lâminas rotativas. Diferentes eixos de capacidade são disponíveis, permitindo tamanhos de amostra tão pequenos quanto 1 ml.

1.1.6 Digestão enzimática: É frequentemente usada para extração de proteínas de bactérias, leveduras ou outros organismos com membranas celulares circundadas por uma estrutura de proteção. É também usada para extração de proteínas de células de eucariotos embebidas em tecido fibroso, como por exemplo, onde a collagenase pode ser apropriada para a quebra do colágeno fibrilar. As enzimas destroem paredes, capas, cápsulas, capsídeos, ou outras estruturas que não são facilmente rompidas pelo método mecânico somente. A digestão enzimática é frequentemente seguida pela homogeneização, sonicação, ou vortex vigoroso em tampão de lise. Exemplos de enzimas: Lisozima para células bacterianas, zimolase para leveduras, etc.

1.1.7 Descompressão explosiva: Esta técnica é mais usualmente aplicada para bactérias, leveduras ou células de plantas. As células são equilibradas com gás inerte, como o nitrogênio a alta pressão (5500 KPA/800 psi). A amostra é transferida da câmara de alta pressão através de um orifício na câmara. É um método eficiente para volumes grandes.

1.1.8 Kits de preparação de amostras: GE Healthcare oferece vários produtos para a extração de células de mamíferos, leveduras, bactérias e tecidos animais.

1.2 Eletroforese em gel

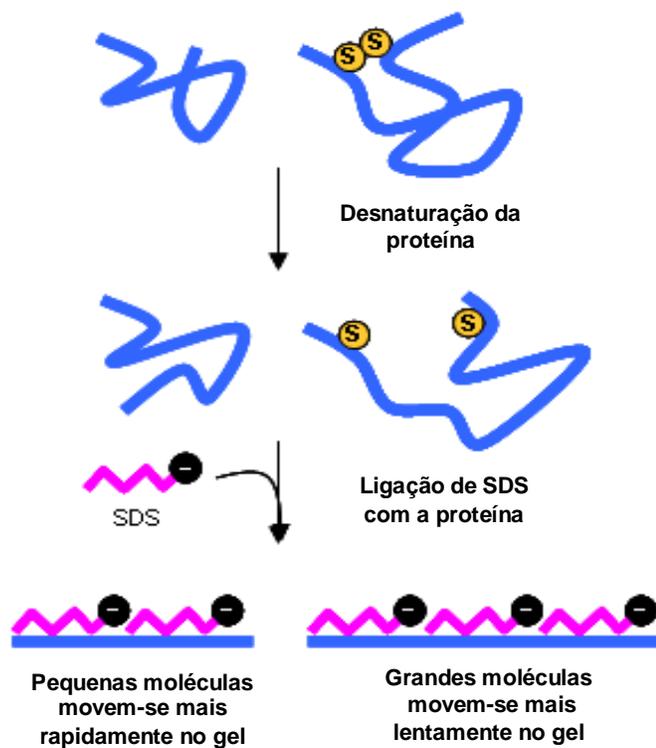
A eletroforese se baseia no fato de todas as proteínas apresentarem uma carga elétrica global quando colocadas num meio de pH diferente do seu ponto isoelétrico. Deste modo é possível provocar a migração de proteínas sujeitando-as a um campo elétrico. Esta migração irá variar de acordo com a proteína, uma vez que é influenciada pelo tamanho, carga, forma e composição química de cada molécula.

Os géis de poliacrilamida têm poros de dimensões moleculares, sendo que a separação nessas malhas é baseada tanto nos princípios da filtração em gel como na

mobilidade eletroforética das moléculas. Nesse sentido, na eletroforese em gel, as grandes moléculas têm sua migração retardada com relação às moléculas de menor tamanho. Existem diversos sistemas de análise através de eletroforese em gel de poliacrilamida.

- **Eletroforese em condições não-desnaturantes:** normalmente empregada quando a análise da atividade biológica deve ser testada. Assim, a manutenção da proteína na sua conformação se faz necessária, evitando o uso de agentes desnaturantes.

- **Eletroforese em condições desnaturantes:** emprega na maioria das vezes o detergente iônico forte SDS (dodecil sulfato de sódio) em combinação com um agente redutor (por exemplo, o β -mercaptoetanol) e calor (aquecimento da amostra a 100°C). Nessas condições, as proteínas da amostra tornam-se completamente dissociadas/desagregadas, preservando apenas sua estrutura primária (SDS-PAGE).



Os polipeptídeos desnaturados ligam-se ao SDS e tornam-se carregados negativamente. A migração do complexo SDS-proteína através do gel de poliacrilamida dá-se em função do tamanho do polipeptídeo, uma vez que a quantidade de SDS ligado à proteína independe de sua sequência primária de aminoácidos e é proporcional à sua massa molecular (tamanho). Na saturação, cerca de 1,4 g de SDS é ligado por grama de

proteína, o que corresponde a cerca de uma molécula de SDS para cada 2 resíduos de aminoácidos. Nessas condições, a mobilidade relativa de uma proteína varia linearmente com o logaritmo de sua massa molecular.

Os géis de poliacrilamida são constituídos pela polimerização da acrilamida e da N,N'-metilenobisacrilamida, que é induzida por radicais livres. O persulfato de amônio (PSA) presente na solução se decompõe naturalmente formando radicais livres.

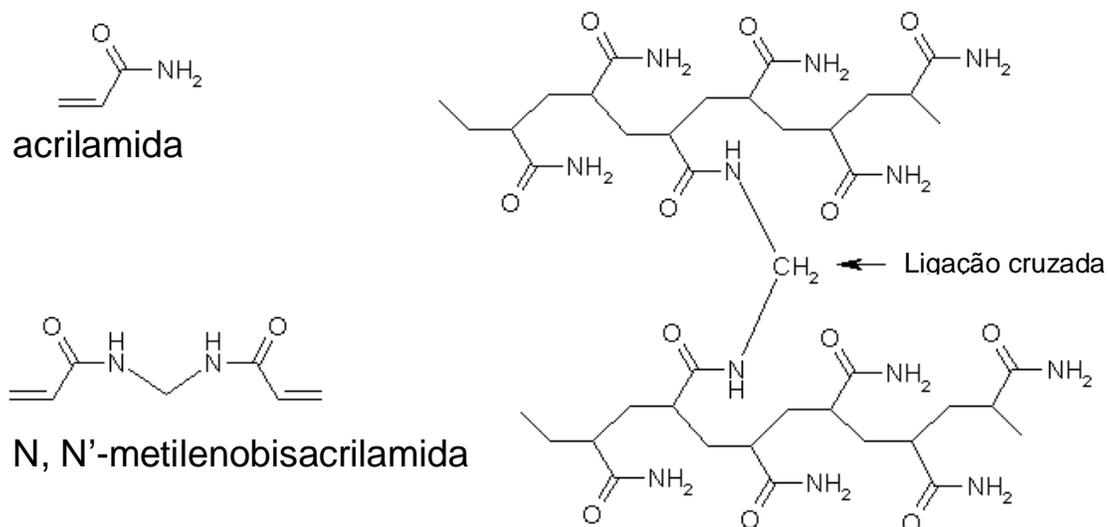
O PSA ativa o TEMED, deixando-o com um elétron desemparelhado. Este radical reage então com uma molécula de acrilamida, transformando-a também num radical. Este, por sua vez, reage com um outro monômero de acrilamida, dando origem a novo radical e assim sucessivamente até formar um polímero com ligações cruzadas (“crosslinked”).

A formação do polímero entre acrilamida ligada a N, N'-metilenobisacrilamida determina a dimensão dos poros formados (malha) no gel e depende da quantidade de ligações cruzadas, variando em função da concentração de acrilamida e N, N'-metilenobisacrilamida. O número de ligações controla o tamanho dos poros do gel e determina o intervalo de massa molecular das proteínas que podem ser separadas nesse gel. O comprimento médio das cadeias é determinado pela concentração relativa da acrilamida e a quantidade de bisacrilamida. Portanto a relação entre a quantidade de acrilamida e bisacrilamida determina as propriedades físicas do gel, que darão subsídios para separação nesse tipo de gel. Géis com 15% de acrilamida são utilizados para separar proteínas de baixa massa molecular, enquanto géis de menor concentração de acrilamida, até 7.5%, são utilizados para separar proteínas de alta massa molecular. Veja tabela abaixo:

Acrilamida	Proteínas KDa
5%	60-350
10%	15-200
15%	10-100

Os géis de poliacrilamida devem ser preparados entre duas placas de vidro, pois necessitam de um ambiente isento de oxigênio (inibidor da reação) para se polimerizar. O sistema SDS-PAGE consiste de dois géis que apresentam composição e função diferentes: o gel concentrador e o gel separador. O gel concentrador é constituído por uma malha de grande porosidade (gel de poliacrilamida a 5%). Sua função é compactar a amostra em um pequeno volume, depositando-a sobre a superfície limite do gel separador. O gel separador apresenta uma malha de poros menores (poliacrilamida na

faixa de 8% a 20%) e funciona separando os complexos SDS-proteína em função de suas massas moleculares (efeito de peneiramento molecular). O desenvolvimento de géis de duas fases permite que as misturas proteicas colocadas em cada poço sejam concentradas antes da corrida no gel, aumentando-se assim, significativamente, a resolução das proteínas.



A carga elétrica aplicada na solução é efetuada através de eletrodos (que são colocados na solução). Um íon migra através da solução na direção ao eletrodo de carga oposta. Portanto, uma partícula carregada positivamente (cátion) migra para o polo negativo (cátodo), enquanto as partículas negativas (ânions) migram para o polo positivo (ânodo).

A separação depende de vários fatores que influenciam e que podem ser resumidas em: Força aplicada nas partículas (voltagem), carga da partícula, pH do meio, condutividade do meio, resistência da matriz, conformação da partícula, força iônica do meio, temperatura, etc.

O pH da solução é escolhido de tal forma, que a partícula a ser separada pela eletroforese, se mantenha em um estado máximo de carga, para sua máxima separação.

A força exercida em uma partícula carregada depende do campo elétrico, voltagem (ou volts por centímetro), e a carga da partícula. Em qualquer sistema elétrico, a corrente produzida é proporcional à voltagem aplicada. A voltagem, condutividade, e a corrente, portanto, estão todas relacionadas. Se a condutividade está aumentada pelo

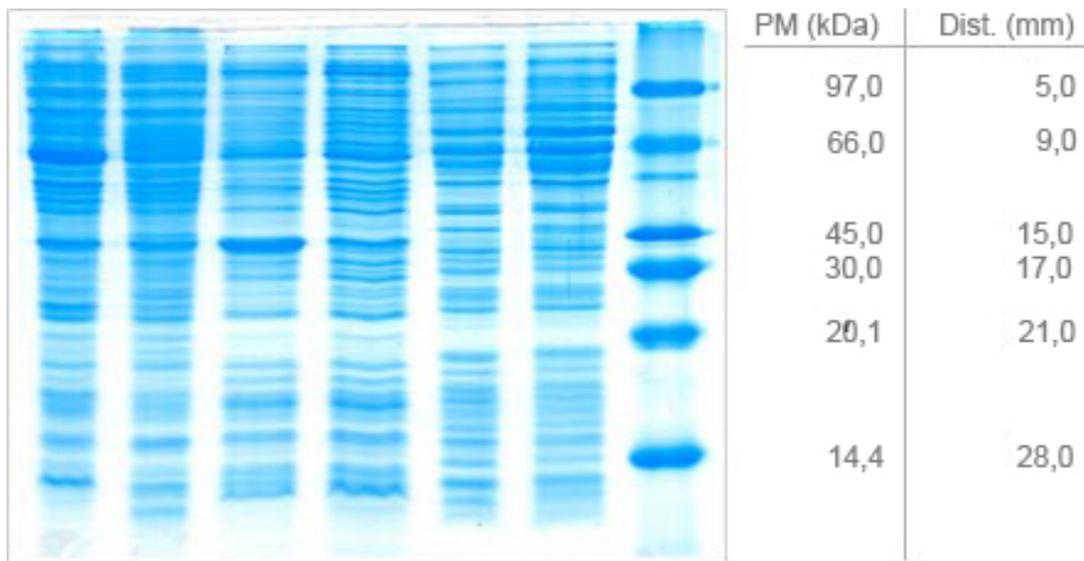
aumento da concentração salina, a corrente se mantém constante e a voltagem deve decrescer. Se a voltagem decresce, reduz a força elétrica nas partículas carregadas, diminuindo o movimento das macromoléculas. O aumento do tempo seria necessário para uma separação, e a resolução diminui devido ao aumento da difusão.

Na maioria dos casos, o sistema SDS-PAGE é realizado com um sistema de tampão descontínuo, no qual o tampão nos reservatórios da cuba de eletroforese apresenta pH e força iônica diferentes do tampão usado para confeccionar o gel. Quando a amostra é aplicada, os complexos SDS-proteína são arrastados por uma fronteira de íons em movimento, que é criada quando a corrente elétrica passa através dos eletrodos, do pólo negativo em direção ao pólo positivo. A combinação do sistema descontínuo de tampão com grande porosidade do gel concentrador promove o efeito de empacotamento da amostra, o qual é crucial para a alta resolução desse sistema de separação.

Depois de separadas num gel de poliacrilamida, as proteínas podem ser visualizadas por coloração do gel com uma solução de Coomassie azul.

Marcadores:

A corrida simultânea de proteínas de peso molecular conhecido (marcador de pesos moleculares), permite determinar para cada gel a relação entre peso molecular e distância de migração. Para proteínas com pesos moleculares dentro da gama útil é possível estabelecer uma relação linear entre o logaritmo do peso molecular e a distância de migração no gel.



$\text{Log}_{10}[\text{Peso Molecular (kDa)}] = -0,0375 \text{ Dist. (mm)} + 2,16$

1.3 Transferência (“blotting”)

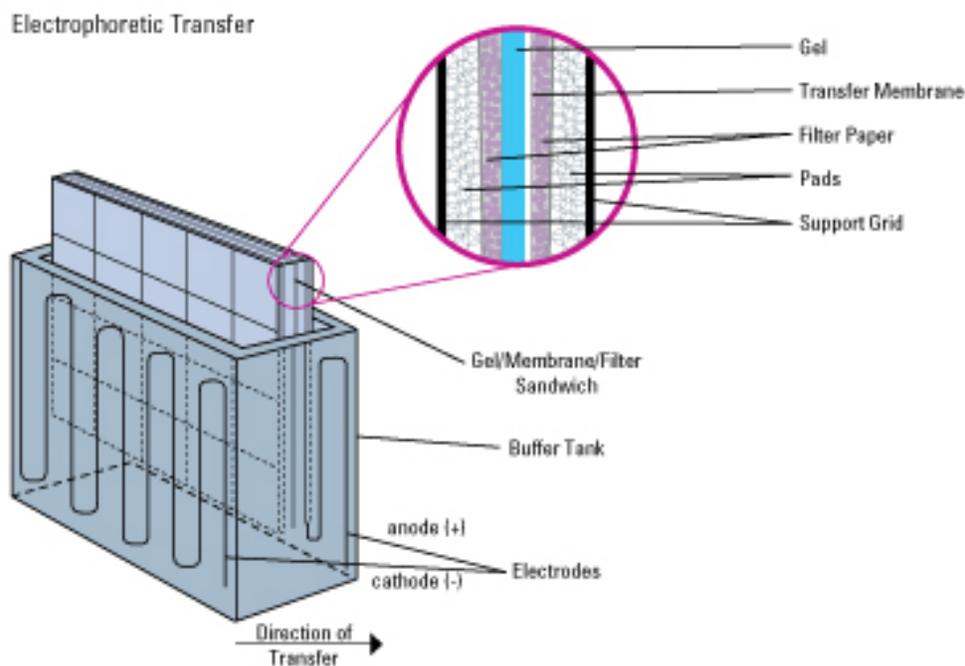
Seguindo a eletroforese, a proteína pode ser transferida do gel de eletroforese para a membrana. O termo “blotting” se refere a técnicas de transferência de proteínas presentes em um gel de SDS-PAGE para uma matriz como uma membrana de nitrocelulose ou fluoreto de polivinilidina (PVDF). Obtêm-se então, após a transferência, as proteínas ligadas e imobilizadas nesta membrana. Esta etapa tem a vantagem de permitir maior acessibilidade às proteínas ligadas à superfície da membrana, quando comparada a estas dentro da matriz do gel. Além disso, quando as proteínas estão imobilizadas em uma fina membrana podem ser muito mais rápidas as reações de coloração e descoloração, lavagem, incubação, etc.

Há uma variedade de métodos que podem ser usados, sendo o mais comumente usado a eletroeluição ou transferência eletroforética, por causa de sua eficiência e rapidez. Este método usa a mobilidade eletroforética das proteínas para transferi-las do gel para a membrana. A transferência eletroforética de proteínas envolve a passagem das proteínas contidas no gel de poliacrilamida em contato direto com um pedaço de nitrocelulose ou outro adequado, montados em um “sanduíche” de papel de filtro colocado entre 2 eletrodos submersos em uma solução de condução. Quando uma corrente elétrica é aplicada, as proteínas movem-se do gel de poliacrilamida para a superfície da membrana, onde as proteínas tornam-se hermeticamente ligadas. O resultado é a membrana com uma cópia do padrão de proteína que estava originalmente no gel de poliacrilamida.

A eficiência da transferência pode variar dramaticamente entre proteínas, baseada na habilidade da proteína migrar do gel e a propensão de ligar-se à membrana sob um particular conjunto de condições. A eficiência da transferência depende também de fatores como a composição do gel, contato completo do gel com a membrana, a posição dos eletrodos, o tempo de transferência, tamanho e composição das proteínas, a intensidade do campo e a presença de detergente e álcool no tampão. Ótima transferência é geralmente obtida em tampões com baixa força iônica e com baixa corrente elétrica.

Depois da transferência, a proteína total sobre a membrana é freqüentemente corada com um corante como Ponceau, para checar a eficiência da transferência; o gel também pode ser corado para confirmar que a proteína moveu-se do gel, mas isto não assegura ligação da proteína à membrana. Devido ao fato de os corantes interferirem

com a ligação do anticorpo e detecção, é ideal um corante que seja facilmente removível como o Ponceau.



1.4 Bloqueio de sítios inespecíficos

Esta etapa é realizada para evitar reações inespecíficas, pois a membrana usada em WB tem uma grande afinidade por proteínas. Portanto, depois da transferência das proteínas do gel para a membrana, é importante bloquear a superfície remanescente da membrana prevenindo ligações não específicas dos anticorpos de detecção durante os passos subsequentes. Uma variedade de tampões de bloqueio que vão do leite ao soro normal para proteínas purificadas têm sido usadas para bloquear sítios livres sobre a membrana. Os tampões de bloqueio aumentam a sensibilidade do ensaio pela redução da interferência de fundo.

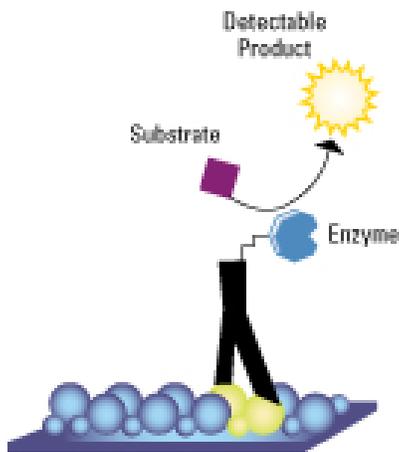
	Concentração recomendada	Tampão
Soro albumina bovina (BSA)	0,2 – 5%	TBS / PBS
Leite livre de gordura	3-5%	TBS / PBS
Caseína	1%	TBS
Soro	1-5%	TBS / PBS

1.5 Ligação dos Anticorpos

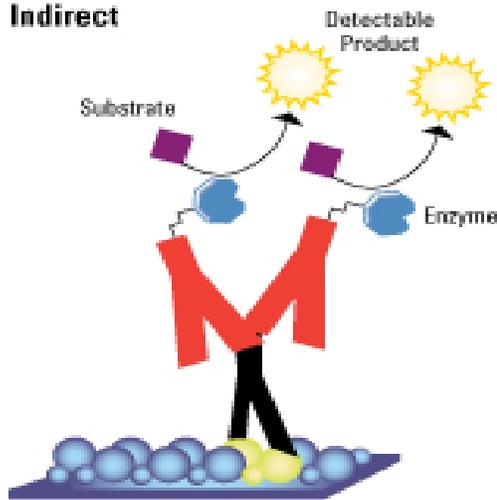
A separação de proteínas por SDS-PAGE permite determinar a abundância relativa de proteínas numa amostra, se estas se encontrarem bem separadas no gel. A identificação e quantificação de proteínas é realizada por imunodeteção/imunoquantificação. Uma variação comum envolve imunodeteção direta ou indireta. Com o método de detecção direta, o anticorpo primário que é usado para detectar um antígeno sobre a membrana é marcado com uma enzima ou tinta fluorescente. Este método de detecção não é muito usado sendo preferível o método indireto por várias razões: No método indireto, o anticorpo primário é adicionado primeiro para ligar-se ao antígeno. Este é seguido pelo anticorpo secundário marcado que é dirigido contra o anticorpo primário. Marcadores incluem biotina, sondas fluorescentes como a fluoresceína e a rodamina, e enzimas conjugadas como peroxidase rábano silvestre (*horseradish*) ou fosfatase alcalina. O método indireto oferece muitas vantagens sobre o método direto:

- Anticorpo secundário pode amplificar o sinal.
- Uma variedade de anticorpos secundários marcados é disponível.
- Um anticorpo secundário pode ser usado com muitos anticorpos primários.
- Marcação não afeta a imunoreatividade do anticorpo primário.

Direct



Indirect



A escolha do anticorpo primário para WB depende do antígeno a ser detectado e quais anticorpos estão disponíveis para este antígeno. Em geral o anticorpo primário, o qual se liga à proteína alvo na membrana, não é diretamente detectável. Portanto, anticorpos secundários ou outros reagentes de detecção podem ser usados para a detecção.

Anticorpos para WB são tipicamente usados em diluições de 1/100 – 1/500.000 de uma solução estoque de 1 mg/ml, sendo a diluição ótima determinada experimentalmente. Sistemas de detecção mais sensíveis requerem menos anticorpos que sistemas menos sensíveis e podem resultar em ganho substancial sobre o custo do anticorpo e permitir que uma limitada quantidade de anticorpos seja usada em mais experimentos. Usando menores quantidades de anticorpos há o benefício adicional de

diminuir ligações inespecíficas, pois uma limitada quantidade de anticorpo mostra aumento da especificidade com maior afinidade. O uso de detergentes auxilia também a diminuir a inespecificidade. Lavagens com detergentes entre os anticorpos primário e secundário devem ser realizadas.

Detergente	Concentração recomendada	Tampão
SDS	0,02 - 0,05%	TBS / PBS
Triton X-10	1%	TBS / PBS
Tween 20	0,05 - 0,1%	TBS / PBS
NP ₄ D	0,02 - 0,05%	TBS / PBS

1.6 Detecção e documentação:

Anticorpos conjugados às enzimas oferecem uma maior flexibilidade na detecção e documentação para WB, por causa de uma variedade de substratos disponíveis. Embora eles requeiram passos extras, podem ser extremamente sensíveis quando otimizados com substrato apropriado. Fosfatase alcalina e peroxidase são as duas enzimas mais usadas como marcadores para detecção de proteínas. Uma matriz de substratos cromogênicos, fluorogênicos ou quimioluminescentes estão disponíveis para uso com essas enzimas. Fosfatase alcalina oferece uma vantagem distinta sobre outras enzimas, sua taxa de reação permanece linear permitindo que a reação proceda por um período mais longo. Infelizmente, o aumento no tempo de reação frequentemente leva ao aumento de sinais inespecíficos. Peroxidase conjugada a anticorpos é considerada superior ao conjugado anticorpo-fosfatase alcalina com respeito à atividade específica devido ao tamanho pequeno da enzima peroxidase e compatibilidade com as reações de conjugação. Em adição, a maior taxa de atividade, boa estabilidade, baixo custo e ampla disponibilidade fazem da peroxidase a enzima de escolha para muitas aplicações.

No caso da detecção de proteínas em baixa concentração um complexo estreptavidina-biotina-peroxidase pode ser utilizado. Nesse caso o anticorpo secundário biotinilado reage com várias moléculas de estreptavidina conjugada à peroxidase, aumentando a sensibilidade do método.

Métodos de detecção

1.6.1 Colorimétrico: Um método de detecção/documentação simples é o uso de substratos cromogênicos. Apesar de não serem tão sensíveis como os outros substratos,

o substrato cromogênico permite direta visualização da ligação. Infelizmente, substratos cromogênicos tendem a desaparecer à medida que a membrana seca ou quando estocado tornando-o pouco viável para documentação. No entanto, pode-se fazer fotocópia ou escanear para fazer uma réplica permanente do resultado. Um exemplo é o uso da 3'-3' diaminobenzidina (DABI) que é oxidada pelo peróxido de hidrogênio na presença da peroxidase dando um produto insolúvel de cor marrom que precipita no local onde estão as proteínas.

1.6.2 Fluorescência: É o método mais recente. Os anticorpos secundários são marcados com um fluorocromo. O sinal fluorescente pode ser detectado diretamente usando um “scanner” a laser ou uma câmera equipada com apropriada fonte de luz e filtros. Independente do método de detecção, a intensidade do sinal correlaciona-se com a quantidade de proteína e pode ser visualmente estimado ou quantificado usando análise em software. O uso de anticorpos conjugados a um fluorocromo em um imunoenensaio requer poucos passos porque não há desenvolvimento de substrato no ensaio. Apesar de o método ser rápido, ele requer equipamento especial para detectar e documentar o sinal fluorescente devido à necessidade de fonte de luz de excitação. Os avanços recentes na imagem digital e o desenvolvimento de novos fluorocromos como o infravermelho e pontos quânticos, têm aumentado a sensibilidade do uso de sondas fluorescentes para WB.

1.6.3 Quimioluminescência: É o método de detecção mais comumente usado, baseado sobre anticorpos secundários conjugados com enzima peroxidase. Sobre a adição de um peróxido – reagente base, a enzima catalisa a oxidação do luminol resultando na emissão de luz. O sinal luminoso pode ser capturado usando uma carga da imagem da câmera acoplada com base em dispositivo ou pela exposição ao filme de raios-X. Substratos quimioluminescentes diferem de outros substratos no qual o sinal é um produto transitório da reação enzima-substrato e persiste somente enquanto a reação está ocorrendo. Se o substrato é usado ou a enzima perde a atividade, então a reação cessa e o sinal é perdido. Entretanto em ensaios bem otimizados usando diluições apropriadas de anticorpos e substrato suficiente, a reação pode produzir saída estável de luz por 1 a 24 horas dependendo do substrato, permitindo detecção sensível e consistente que pode ser documentada com raios-X ou equipamento de imagem digital. Destes métodos de documentação, o raios-X é o método mais sensível em parte porque

o filme é mais densamente revestido com moléculas foto-reativas que a imagem digital que tem fotosensores. Também, o filme é colocado em contato direto com a membrana, separado somente por uma folha plástica fina e transparente, permitindo que mais fótons de luz colidam com a emulsão do filme que com o sensor digital que está localizado atrás de uma ou mais lentes focais. Por esta razão, o tempo de exposição aos filmes é mais curto que o requerido para o equipamento digital. Infelizmente, parte da sensibilidade será perdida quando a varredura digital do filme for feita para fins de publicação. Imagens digitais contornam este passo fazendo imagem digital direta da membrana, economizando tempo no processamento da imagem e manipulação dos dados.

OBJETIVO

- Conhecer todas as etapas da metodologia de “Western Blotting” que permite detectar e analisar proteínas.

ROTEIRO DOS EXPERIMENTOS

1. Preparo da amostra

1.1 Soluções:

1.1.1 Tampão de homogeneização

Tris	50 mM	0,6055 g
NaCl	600 mM	3,5064 g
EDTA	1 mM	0,0372 g
Água miliQ q.s.p.		100 ml

1.1.2 Inibidores de proteases: devem ser adicionados imediatamente antes da adição dos tampões de lise (para extração de enzimas, eletroforese) para evitar-se que as proteases intracelulares digiram as proteínas de interesse. Usar pelo menos leupeptina (ou aprotinina ou TLCK) e PMSF. As soluções estoques de inibidores devem ser conservadas no freezer (-20°C).

- **Leupeptina (Sigma L8511, hemissulfato):** preparar solução-estoque de 5 mg/ml em água miliQ. Manter a solução estoque a -20°C.

- **Aprotinina** (Sigma A1153, liofilizada): preparar solução estoque a 5 mg/ml preparada em água miliQ. Manter a solução-estoque a -20°C.

- **TLCK** (Sigma T7254, cloridrato de N-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona); preparar solução estoque a 20 mM (73,86 mg/10 ml em água de água miliQ). Manter a solução estoque a -20°C.

- **PMSF** (Fluoreto de Fenil-Metil Sulfonila; Sigma P7626; PM: 174,19 g/mol): o PMSF é extremamente instável na água e NÃO PODE ser preparado em sopas de inibidores de proteases, devendo ser preparado sempre em soluções-estoque ISOPROPANÓLICAS e adicionado aos tampões de lise no momento do uso. Preparar uma solução-estoque a 100 mM em isopropanol (174,2 mg/10 ml de isopropanol). Manter a solução-estoque a -20°C.

1.1.3 Tampão de lise para eletroforese com inibidores de proteases:

Para cada 100 ml de tampão de homogeneização adicionar os seguintes inibidores de proteases:

- 40 µl de solução estoque de leupeptina 5 mg/ml (concentração final: 2 µg/ml).
- 40 µl de solução estoque de aprotinina 5 mg/ml (concentração final 2 µg/ml).
- 100 µl de solução estoque de TLCK 20 mM (concentração final 20 µM)
- 100 µl de PMSF 100 mM (concentração final 100 µM). No momento do uso, adicionar 1 µl de solução estoque isopropanólica por ml de tampão de lise (concentração final 100 µM).

1.1.4 Tampão de amostra

Água miliQ	3,8 ml
Tris HCl pH 6,8 0,125M	1,0 ml
Glicerol	0,8 ml
SDS 10%	1,6 ml
2-mercaptoetanol	0,4 ml
Azul de bromofenol 1%	0,4 ml

OBS: Armazenar o tampão de amostra a 4°C. Devido à quantidade de SDS pode ser que a 4°C o líquido torne-se “meio viscoso”, então antes do uso deixar fora da geladeira ± 15 min.

1.2 Procedimento:

- 1.2.1 Coletar o fígado, cortar um pedaço em torno de 600 mg e pesar;
- 1.2.2 O restante do fígado pode ser congelado e armazenado em nitrogênio líquido;
- 1.2.3 Transferir o pedaço de fígado para um tubo de centrifuga mantido em gelo, e adicionar tampão de lise gelado, na proporção de 3,0 ml para 600 mg de fígado;
- 1.2.4 Levar ao Politron para macerar o tecido;
- 1.2.5 Após macerar todos os tecidos, transferir o extrato para tubos “ependorf” de 2 ml e manter em gelo;
- 1.2.6 Adicionar 100µl de Triton-X 10%, homogeneizar manualmente e aguardar 30 min em gelo;
- 1.2.7 Calibrar os tubos e centrifugar por 30-40 min. / 12.000 rpm / 4°C;
- 1.2.8 Pipetar a proteína (líquido sobrenadante abaixo do disco de gordura) – alíquotar em 02 eppendorfs de 0,6 ml (armazenar a -80°C ou nitrogênio líquido);
- 1.2.9 Após a dosagem de proteínas, fazer a diluição da amostra com tampão de homogeneização de forma a obter 50 a 75 µg de proteínas em 30 µl (volume de cada pocinho do gel)
- 1.2.10 Preparar a amostra que será aplicada em SDS-PAGE: misturar 50 µl da amostra (sobrenadante) com 50 µl de tampão de amostra. Aquecer a 95°C por 4 min em banho-maria. Usar na eletroforese ou armazenar a -80°C ou nitrogênio líquido. (OBS: se congelar, aquecer novamente a 95°C antes de usar).

2. Dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (Biorad)

2.1 Preparo da solução de soro albumina bovina (BSA) para a curva padrão:

- 2.1.1 Pesar 10 mg de BSA e diluir em 10 ml de água miliQ – solução padrão 1 mg/ml
- 2.1.2 Fazer as seguintes diluições com a solução padrão :

Concentração	0,2 mg/dl	0,4 mg/dl	0,6 mg/dl	0,8 mg/dl	0,9 mg/dl
Solução padrão (1mg/ml)	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml	0,45 ml
Água miliQ	0,4 ml	0,3 ml	0,2 ml	0,1 ml	0,05 ml

2.2 Preparo do reagente:

- 2.2.1 Preparar diluindo uma parte de reagente concentrado com 4 partes de água miliQ;
- 2.2.2 Filtrar em papel Whatman #1 (ou equivalente) para remover as partículas;
- 2.2.3 Este reagente diluído pode ser usado por aproximadamente 2 semanas quando mantido à temperatura ambiente.

2.3 Ensaio

- 2.3.1 Em tubos de ensaio pipetar 20 µl de cada padrão (5 diluições) e de cada amostra (diluída 1:50 – 10 µl de amostra + 490 µl de tampão);
- 2.3.2 Adicionar 1,0 ml de reagente diluído em cada tubo e homogeneizar;
- 2.2.3 Fazer os testes em triplicata;
- 2.2.4 Incubar a temperatura ambiente por pelo menos 5 min;
- 2.2.5 Medir a absorbância em 595 nm;
- 2.2.6 Construir o gráfico no Excel e determinar a equação da reta para o cálculo da concentração da amostra.

Estabilidade da reação = 1 hora.

Linearidade do método: 50 a 500µg/ml

3. Eletroforese

3.1 Reagentes

3.1.1 Acrilamida 30%/ Bisacrilamida 0,8%

- 30 g de acrilamida
- 0,8 g de N,N – metileno – bisacrilamida
- Completar o volume para 100 ml de água miliQ

3.1.2 TRIS-HCl 0,5M pH 6,8 / SDS

- 6,05 g trizma base
- 0,4 g de SDS
- Dissolver ambos em 40 ml de água miliQ. Ajustar o pH para 6,8 com HCl e completar o volume para 100 ml.

3.1.3 TRIS-HCl 1,5M pH 8,8

- 18,17 g trizma base
- Dissolver em 40 ml de água miliQ. Ajustar o pH para 8,8 com HCl e completar o volume para 100 ml.

3.1.4 Tampão de eletroforese (4X concentrado)

- 12 g de trizma base
- 57 g de glicina
- 4 g de SDS
- Completar o volume para 1.000 ml com água miliQ.

OBS: Não guardar na geladeira, sempre no armário, devido ao SDS que não pode ser refrigerado.

Tampão de corrida (1X): Para 4 géis preparar 1.100 ml (275 ml de tampão 4 X concentrado e 825 ml de água miliQ)

3.1.5 Tampão de transferência

- 5,82 g de trizma base
- 2,93 g glicina
- 0,375 g SDS
- 200 ml de metanol
- Completar o volume para 1.000 ml com água miliQ

3.2 Montagem do sistema (Equipamento BioRad)

Antes de preparar o gel é necessário montar o sistema na cuba. Para isso, as placas de vidro (o par) devem ser limpas com álcool 70 % e, logo após, posicionadas no sistema (verde) sobre uma bancada reta. O sistema é então fixado através de “presilhas” (2 laterais – verdes e 1 em cima). Pode-se colocar água para ver se há vazamento.

3.3 Preparação do gel

Gel de separação Tris 0,375 M pH 8,8

Compostos	7,5% (2 géis)	7,5% (4 géis)	12% (2 géis)
Água miliQ	4,85 ml	9,7 ml	3,35 ml
Tris 1,5 M – HCl pH 8,8	2,5 ml	5,0 ml	2,5 ml
SDS 10% (estoque)	100 µl	200 µl	100 µl
Acrilamida 30%/Bisacrilamida 0,8%	2,5 ml	5,0 ml	4,0 ml
Persulfato de amônio 10%	50 µl	100 µl	50 µl
TEMED	5µl	10 µl	5 µl
TOTAL	10 ml	20 ml	10 ml

- O TEMED é armazenado a 4°C e o persulfato de amônio a 10% no congelador. Lembrar-se de tirar o persulfato de amônio (10%) do congelador para ir descongelando na hora do preparo do gel.
- Colocar o TEMED por último, pois ele é o catalisador da reação.
- Colocar sempre uma pequena quantidade de água miliQ sobre o gel de separação já entre as placas, pois o oxigênio “impede” a solidificação do gel.

Esperar por volta de 30 a 50 min até o gel de separação se solidificar, então, desprezar a água e secar a superfície com papel filtro absorvente. Só então aplicar o gel de empacotamento sobre o gel de separação.

.Gel de Empacotamento pH 6,8

Compostos	Volume p/ 2 géis	Volume p/ 4 géis
Água miliQ	1,05 ml	2,1 ml
Tris 0,5 M – HCl pH 6,8/SDS	0,630 ml	1,26 ml
Acrilamida 30%/Bisacrilamida 0,8%	0,330 ml	0,660 ml
Persulfato de amônia 10%	13 µl	26 µl
TEMED	10 µl	20 µl
TOTAL	2,0 ml	4,0 ml

- Posicionar o pente adequado no gel de empacotamento e esperar solidificar por 30 a 50 min.

- Nunca deixar formar bolhas entre os géis; elas impedem a transferência de corrente elétrica durante a corrida.
- Depois de o gel solidificar, retirar as “presilhas” e montar o sistema que encaixa na cuba de eletroforese.
- Tirar os pentes e secar os pocinhos (com cuidado) com “tirinhas de papel absorvente”.
- Após isso, colocar o sistema dentro da cuba de transferência (corrida). Colocar antes \pm 500 ml de tampão de eletroforese (uso) e dar uma “balançadinha” para retirar as bolhas abaixo do gel.
- Encher os “pocinhos” com tampão de eletroforese (uso) e aplicar as amostras no fundo dos pocinhos (máximo 30 μ l) com a pipeta de HAMILTON (lavá-la bem com água miliQ entre as aplicações das amostras).
- Completar o volume da cuba com o restante dos 1100 ml de tampão de eletroforese.

3.4 Corrida (eletroforese propriamente dita)

- Antes de aplicar a corrente no sistema, verificar se a tampa está devidamente posicionada, assim como os eletrodos.
LEMBRAR: polo positivo – vermelho polo negativo – preto
- Inicialmente deve-se aplicar uma corrente de 80 V, até o corante penetrar no gel de empacotamento e formar uma linha (\pm 30 min).
- Esta linha indica que as proteínas estão todas posicionadas no início do gel de separação, prontas para corrida. Neste momento, deve-se aplicar uma corrente de 100 V. A corrida terá terminado quando a linha azul sair do gel. (\pm 1,5h após o início).

4. Transferência de proteínas para nitrocelulose

OBS: Lembrar-se de marcar (cortar) o canto esquerdo inferior do gel, lado que corre os pesos moleculares conhecidos.

4.1 Com o tampão de transferência equilibre o gel de acrilamida por **20** a 60 min;

4.2 Corte a membrana e o papel de filtro do tamanho do gel e umedeça no tampão por 5-10 min;

4.3 Retire a cobertura de segurança do equipamento (semi-dry) e prepare o “sanduíche” do gel como a seguir:

- No espaço da base do fundo (ânodo – polo negativo) colocar:
 - Papel de filtro pré-umidecido
 - Membrana pré-umidecida
 - Gel equilibrado
 - Papel de filtro pré-umidecido

OBS: Usar o “rolinho” entre as camadas para retirar as bolhas.

4.4 Assegure que o sanduíche esteja tocando o topo do catodo (polo positivo) e cubra cuidadosamente;

4.5 Corra o blot;

Gel pequeno: 14 V por 15 min

4.6 Desligue a fonte de energia, retire os eletrodos, e remova o blot.

5. Imunodeteção SNAP i.d. (GE Healthcare)

5.1 Soluções:

5.1.1 Solução de bloqueio: Leite com baixo ou nenhum teor de gordura a 0,5% (0,5 g/ 100 ml) em tampão TBS contendo 0,1% de tween 20 (100 µl/ 100 ml). Centrifugar antes de usar, pois é essencial que as soluções estejam completamente solubilizadas e livres de qualquer matéria particulada.

5.1.2 Anticorpo primário e secundário: diluir em TBS contendo 0,1% de tween 20 (TBS-T) e 0,5% de leite com baixo ou nenhum teor de gordura.

Tampão TBS pH 7,6 – 1 litro (Tris 20 mM)

Tris	2,42 g
Cloreto de sódio	8,0 g
Água miliQ q.s.p.	1,0 litro
Acertar pH para 7,6	

Tampão TBS – Tween (0,1%) - TBS-T

Tampão TBS	50ml
Tween 20	50 µl

5.2 Procedimento:

5.2.1 Abrir a tampa do suporte de membrana, tomando cuidado para não danificar a superfície branca interna;

5.2.2 Molhar a superfície branca do suporte de membrana com água miliQ. Se usar somente um espaço de um suporte duplo ou triplo, o espaço não usado deve ser molhado também;

- 5.2.3 Colocar a membrana de nitrocelulose pré-molhada no centro do suporte com o lado da proteína virado para baixo. A membrana não deve exceder o tamanho do espaço;
- 5.2.4 Passar gentilmente o rolo sobre a membrana para remover as bolhas;
- 5.2.5 Colocar o espaçador (não é necessário molhar) em cima da membrana e rolar de novo para garantir o contato do espaçador com a membrana;
- 5.2.6 Fechar o suporte;
- 5.2.7 Abrir a tampa do sistema e colocar o suporte na câmara. Alinhar as abas do suporte com os entalhes da câmara. Fechar e travar a tampa;
- 5.2.8 Adicionar solução de bloqueio:
 - 30 ml para espaço simples
 - 15 ml para espaço duplo
 - 10 ml para espaço triplo
- 5.2.9 Aplicar o vácuo até a solução ter sido totalmente aspirada. Desligar o vácuo;
- 5.2.10 Adicionar volume adequado de anticorpo primário, sobre toda a superfície da membrana:
 - 3 ml para espaço simples
 - 1,5 ml para espaço duplo
 - 1,0 ml para espaço triplo

OBS: Usar concentrações 3 a 5 vezes maiores de anticorpos que o habitual.

- 5.2.11 Incubar 10 min à temperatura ambiente (a solução deve ser absorvida pelo suporte ficando a superfície seca). Aplicar o vácuo;
- 5.2.12 Com o vácuo contínuo lavar 3 vezes com o tampão TBS-T (volumes abaixo):
 - 30 ml para espaço simples
 - 15 ml para espaço duplo
 - 10 ml para espaço triplo
- 5.2.13 Adicionar volume adequado de anticorpo secundário, sobre toda a superfície da membrana:
 - 3 ml para espaço simples
 - 1,5 ml para espaço duplo
 - 1,0 ml para espaço triplo

OBS: Usar concentrações 3 a 5 vezes maiores de anticorpos que o habitual

- 5.2.14 Incubar 10 min à temperatura ambiente (a solução deve ser absorvida pelo suporte ficando a superfície seca). Aplicar o vácuo;
- 5.2.15 Com o vácuo contínuo lavar 3 vezes com o tampão TBS-T (volumes abaixo):
 - 30 ml para espaço simples
 - 15 ml para espaço duplo
 - 10 ml para espaço triplo
- 5.2.16 Desligar o vácuo. Remover a membrana e incubar com reagente apropriado para detecção.
- 5.2.17 Revelação em DABI e H₂O₂ – 1 comprimido de DABI (10 mg/ml) + 20 µl de H₂O₂ + 50 ml de TBS-T (reação no escuro).

REFERÊNCIAS

Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, De-Souza MT. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. Brasília: **Editora Universidade de Brasília** p. 175-201, 2003.

Davis BJ. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Ann N Y Acad Sci.** 121:404-427, 1964.

Hames BD. “One-dimensional polyacrilamide gel eletroforesis”. Gel eletrophoresis – a practical approach. 2. ed. Nova York: IRL Press, **Oxford University Press**, 1990.

Harlow E, Lane D. “Antibodies”. A Laboratory Manual. p. 471-504. Cold Spring Harbor, Nova York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1988.

Ornstein L. Disc electrophoresis. I. Background and theory. **Ann N Y Acad Sci.** 121:321-349, 1964

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A** 76: 4350-4354, 1979.

ENSAIO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS EM *TRYPANOSOMA*

CRUZI

Angelo de Oliveira Caleare
Celso Vataru Nakamura
Francielle Pelegrin Garcia
Hélito Volpato
Jean Henrique da Silva Rodrigues
Solange Cardoso Martins

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).

2. 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 alteração da membrana plasmática em citometria de fluxo;
- Verificar se o composto causa alterações na morfologia do protozoário através de microscopia eletrônica de varredura.

3. 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$);
- Homogeneizar o tubo 2 e transferir 500 μL deste para o tubo 3 (C: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$);
- Homogeneizar o tubo 3 e transferir 200 μL deste para o tubo 4 (C: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

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 (10^4), obtendo-se um número **X** de protozoários;

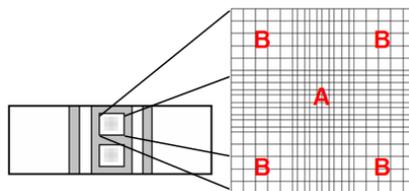


Figura 1. Hematímetro ou Câmara de Neubauer.

- 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 33,75 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 obtida 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

- Usar garrafas de cultura média com tapete de células fechado 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;
- 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 96 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.

DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica que possibilita a análise simultânea de múltiplas características celulares em amostras em suspensão. Podem ser analisados

parâmetros como: tamanho celular (FSC), granulometria (SSC) e comprimentos de onda específicos. Esta técnica baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo intercalar o DNA e emitir fluorescência. Células com membrana plasmática íntegra são impermeáveis ao iodeto de propídeo, enquanto aquelas com dano de membrana são permeáveis a este marcador.

- Tratar as células da mesma forma como foi no ensaio antiproliferativo, incubando por 24h;
- Recolher as células, centrifugar e lavar com PBS por 2x;
- Adicionar 50µL de solução de iodeto de propídeo em PBS (2µg/mL) à suspensão celular;
- Agitar e incubar a temperatura ambiente por 5 min.;
- Realizar a leitura em citômetro de fluxo BD FACSCALIBUR® no canal de leitura FL2.

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 *Cardiopatía 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. 11^oEd., 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.

EVIDENCIAÇÃO NEURONAL ENTÉRICA EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS E MÉTODOS DE ANÁLISE

Maria Raquel Marçal Natali
Nilza Cristina Buttow
Ana Paula de Santi Rampazzo
Aline Cristine da Silva de Souza
Stephanie Carvalho Borges
Fernando Carlos de Souza
Paulo Emílio Botura Ferreira
Carla Possani Cirilo
Rodrigo Mello Gomes

1. TRATO GASTRINTESTINAL E SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE)

O sistema digestório consiste em: cavidade oral, esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso, glândulas associadas: salivares, fígado e pâncreas, além da vesícula biliar. Este sistema tem a função de obter dos nutrientes ingeridos, moléculas necessárias para manutenção, crescimento e demais necessidades energéticas dos organismos (Junqueira e Carneiro, 2011). Somente o tubo digestório tem cerca de 9 metros de comprimento e está subdividido em regiões morfológicamente distintas: esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (ceco, cólon, reto e canal anal) (Gartner e Hiatt, 2003).

Existem quatro camadas histológicas que constituem o tubo digestório: mucosa, submucosa, muscular externa e serosa (ou adventícia), sendo estas inervadas por nervos parassimpáticos e simpáticos, assim como por fibras sensitivas (Gartner e Hiatt, 2003). Tais camadas ou túnicas são semelhantes em toda extensão do trato gastrointestinal, entretanto apresentam algumas modificações e especializações regionais:

- a) Mucosa: Composta por um revestimento epitelial, abaixo do qual há um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos, denominado lâmina própria e uma camada muscular que a envolve, denominada muscular da mucosa (Gartner e Hiatt, 2003; Junqueira e Carneiro, 2011);

- b) Submucosa: Camada de tecido conjuntivo denso não modelado sem a presença de glândulas (exceto no esôfago e duodeno), apresentando vasos sanguíneos e linfáticos bem como o plexo nervoso submucoso ou de Meissner (Gartner e Hiatt, 2003);
- c) Muscular externa: Corresponde a uma espessa camada de músculo liso (exceto na porção inicial do esôfago) responsável pela atividade peristáltica (Gartner e Hiatt, 2003), subdividida em duas subcamadas: uma mais interna onde a orientação das fibras musculares é geralmente circular, sendo denominada circular interna e outra mais externa de orientação longitudinal, denominada longitudinal externa. Entre estas duas camadas, observa-se o plexo nervoso mioentérico ou de Auerbach (Junqueira e Carneiro, 2011).
- d) Serosa ou adventícia: Camada que envolve a muscular externa, composta de tecido conjuntivo que pode (serosa), ou não (adventícia), estar circundada pelo epitélio pavimentoso simples (mesotélio) do peritônio visceral (Gartner e Hiatt, 2003);

A inervação deste tubo alimentar é atribuída extrinsecamente aos componentes simpático e parassimpático, e intrinsecamente ao SNE, presente desde o esôfago ao ânus o qual atua de forma independente, sendo que suas funções são moduladas pelo Sistema Nervoso Autônomo (Gartner e Hiatt, 2003).

O SNE possui aproximadamente 10^8 neurônios sensoriais, motores e interneurônios, distribuídos nos dois plexos ganglionados principais: o mioentérico e o submucoso (fig. 1). Embora espacialmente separados a conexão entre os dois sugere que eles compreendem uma unidade integradora (Furness, 2005). Tais neurônios controlam a motilidade intestinal e a secreção, iniciando reflexos em resposta ao conteúdo luminal e a tensão do músculo liso (Furness et al., 1999). Normalmente, estes neurônios organizam-se em grupos de neurônios denominados “gânglios”, podendo ocorrer neurônios isolados, como em roedores (Gabella, 1989). Ao assumir a organização ganglionar, esses neurônios são revestidos externamente por tecido conjuntivo, ricamente vascularizado, separando-os do tecido muscular circundante (Gabella, 1979)

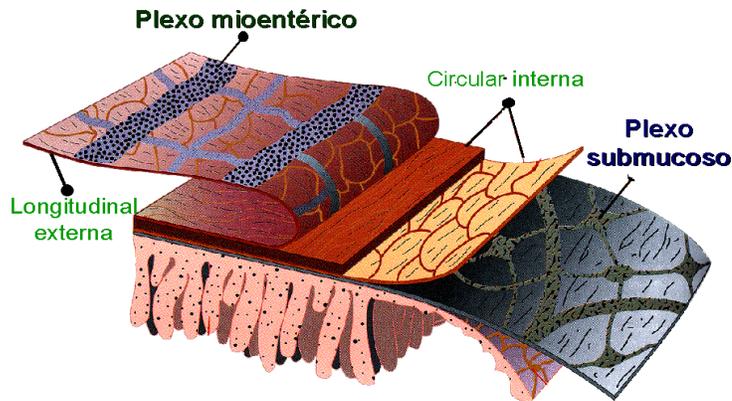


Fig. 1: Principais plexos nervosos do sistema nervoso entérico. Fonte: Furness, 2005 (adaptado).

Os neurônios ganglionares e os seus feixes de fibras nervosas no SNE são providos por numerosas células gliais (Furness, 2005). Tem sido bem estabelecido que estas células desempenham um papel relevante na fisiologia e fisiopatologia do trato gastrointestinal (Ruhl et al., 2004). Este papel está relacionado com sua atuação na homeostase do intestino, bem como serve de elo entre sistema nervoso e imunológico (Ruhl et al. 2004) e ainda, atua no controle do fenótipo neuroquímico (Aubé et al., 2006).

Além disso, semelhante aos neurônios do sistema nervoso central, os neurônios do SNE são bastante diversificados fenotipicamente sendo que mais de 16 populações neuronais distintas já foram identificadas e classificadas pela sua morfologia, conteúdo de neurotransmissor, propriedades eletrofisiológicas de neurônios sensoriais, interneurônios ascendentes e descendentes e neurônios motores excitatórios e inibitórios (Grundy e Schemann, 2005).

Os neurônios sensoriais, atualmente denominados como neurônios intrínsecos primários aferentes (IPANs), traduzem e codificam informações sobre o ambiente químico e estado físico do tecido que eles inervam (Costa, 2000). Os neurônios motores, por sua vez, podem ser divididos em dois grupos, os excitatórios e os inibitórios. Os principais neuromediadores encontrados nos neurônios excitatórios são a acetilcolina e as taquicininas. Já os neurônios inibitórios possuem vários neuromediadores, como NO (óxido nítrico), VIP (peptídeo vaso ativo) e adenosina trifosfato (Furness et al., 1995). Finalmente, os interneurônios são identificados em todas as camadas do trato gastrintestinal, sendo que sua constituição neuroquímica varia muito, dependendo do órgão em questão (Furness et al., 1995).

2. MODELOS EXPERIMENTAIS

2.1. *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla, caracterizada pela deficiência relativa ou absoluta da insulina em exercer sua ação sobre órgãos-responsivos-alvo, conseqüentemente a glicose permanece em concentração alta no sangue, com anormalidades observadas no metabolismo de lipídios, proteínas e carboidratos (Xiang et al., 2010).

Existem duas formas principais de diabetes: dependentes de insulina ou tipo I e não dependentes de insulina ou tipo II (Voet et al., 2002). O tipo I ocorre quando há falta de insulina na corrente sanguínea, ocasionado pela destruição das suas células produtoras. O tipo II ocorre quando há escassez de receptores de insulina nas células normalmente responsivas ao hormônio, também conhecidas como células resistentes à insulina (Voet et al., 2002).

Modelos animais têm sido extensivamente utilizados em pesquisas sobre o diabetes, como por exemplo, a administração de agentes químicos β -citotóxicos como a aloxana e a estreptozotocina (Reis e Alcolado, 2005) que consiste numa maneira eficiente para promover o diabetes tipo I e assim, torna-se possível o estudo de mecanismos fisiopatológicos, atividade hipoglicemiante e anti-diabetogênica de certos compostos. A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico, de natureza glicosamina-nitrosúria, com propriedades tóxicas, isolada de *Streptomyces achromogenes* e é captada pelas células β -pancreáticas através de transportadores de glicose GLUT-2 (Xiang et al., 2010). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a ação da estreptozotocina sobre danos às células β -pancreáticas, Bolzán e Bianchi (2002) relataram que a STZ interfere no metabolismo energético das células β -pancreáticas, comprometendo a biossíntese de insulina e resultando em apoptose celular.

Em nosso laboratório, para o estabelecimento do modelo animal de diabetes mellitus realizamos uma injeção endovenosa (veia peniana) de STZ dissolvida em tampão citrato 10 mmol/L (pH 4,5), em ratos submetidos a um jejum prévio de quatorze horas, na dosagem de 35 mg/kg de peso corporal. Posteriormente, os animais são mantidos em jejum por duas horas para que não haja competição da STZ com a glicose circulante pelas células β -pancreáticas. Após quatro dias de indução, o sangue coletado dos animais é usada para mensuração da glicemia através da determinação fotométrica da glicose por meio de glicoso-colorante-oxidorreductase (glicosímetro Accu-Chek Active, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Alemanha) e/ou também pode ser

realizado o método da glicose oxidase (Bergmeyer e Bernet, 1974), sendo considerados diabéticos todos os ratos que apresentarem glicemia acima de 210 mg/dl. Além disso, mantendo os animais em gaiolas metabólicas individuais, é possível acompanhar o estabelecimento da doença medindo além da glicose, sintomas típicos do diabetes mellitus, tais como: poliúria (aumento da excreção de urina), polidipsia (aumento da ingestão de água) e polifagia (aumento da ingestão de ração).

Geralmente, os primeiros sinais e sintomas do diabetes começam aparecer nos ratos desde os primeiros dias de indução da doença. Desse modo, o período experimental varia conforme o modelo de diabetes que se queira adotar, ou seja, uma semana caracteriza diabetes agudo e quatro semanas ou mais caracterizam o diabetes crônico.

2.2. Restrição alimentar

Estudos têm mostrado que uma moderada redução no consumo calórico pode retardar o envelhecimento, reduzindo doenças crônicas relacionadas à idade (diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas) e estendendo o tempo de vida de várias espécies de fungos, parasitas, moscas e mamíferos (Sohal e Weindruch, 1996; Mattson et al., 2003; Bordone e Guarente, 2005).

Por este motivo, a restrição calórica têm se tornado objeto de estudo de vários pesquisadores nos últimos anos, uma vez que esta prática tem se mostrado capaz de reduzir a taxa de formação de tumores, aumentar a eficiência do sistema imune (Wachsman, 1996), reduzir o metabolismo celular e a apoptose (Zhang e Herman, 2002), melhorar a sinalização neurotrófica (Thrasivoulou et al., 2006), aumentar a plasticidade neuronal (Mattson et al., 2002, 2003), a longevidade e a sobrevivência de neurônios (Johnson et al., 1998; Cowen et al., 2000) e principalmente contribuir para amenizar os efeitos do estresse oxidativo gerado durante o processo de respiração celular, reduzindo o nível de radicais livres (Barja, 2002, 2004; Bokov et al., 2004; Gredilla e Barja, 2005).

Em células com elevado consumo de oxigênio, como os neurônios, os radicais livres são responsáveis por danos celulares cumulativos e irreversíveis, podendo provocar perda da função celular até morte por necrose ou apoptose (Imai e Nagakawa, 2003). Estes danos podem causar alterações estruturais e funcionais do trato gastrointestinal (TGI) durante o processo de envelhecimento. Desta forma, animais

submetidos à restrição calórica podem se tornar modelos experimentais para estudos sobre o envelhecimento.

A restrição calórica é definida como a dieta em que a quantidade diária de alimento ingerido é menor do que a que o animal seria capaz de ingerir até ficar completamente saciado. A restrição pode ser feita tanto controlando a quantidade de alimento fornecido, quanto através da manipulação dos componentes da dieta. As pesquisas conduzidas com restrição calórica têm utilizado diminuição da quantidade de alimento sem manipulação da quantidade e qualidade calórica das dietas. Entretanto, a restrição dietária não deve vir acompanhada de nenhum grau de desnutrição (Masoro et al., 1992), assim como, se a dieta for manipulada deve manter os componentes nutricionais necessários para manutenção do animal (Weihe, 1987).

2.3. Dietas hipercalóricas e obesidade

Para melhor compreensão do papel de cada um dos elementos envolvidos na fisiopatologia do desenvolvimento da obesidade, pesquisadores utilizam-se de diversos modelos experimentais, que podem fornecer subsídios para intervenções e tratamentos destes quadros (Kanasaki et al., 2011). Alguns tipos de obesidade experimental são classificados de acordo com sua etiologia.

Entre os modelos desenvolvidos os que mais se aproximam da obesidade e síndrome metabólica em humanos, são os de obesidade exógena, onde os animais são alimentados com dietas que apresentam valores calóricos mais elevados que a dieta padrão para roedores, podendo ser rica em gorduras ou em carboidratos, ou ainda ser altamente palatável, o que induz a uma hiperfagia persistente (Cesaretti et al., 2006). Destas dietas, a dieta de cafeteria, que mais se aproxima da realidade humana. Neste modelo experimental, é ofertado ao animal juntamente com a ração padrão, alimentos altamente calóricos e palatáveis, tais como bacon, castanhas, leite condensado, refrigerantes, chocolate, amendoim, pão branco, biscoitos, entre outros produtos industrializados, que tendem a provocar um incremento da ingestão calórica desses animais bem como, aumento do peso corporal e da adiposidade, além de desencadear um quadro de síndrome metabólica. Além disso, disfunções endoteliais, alterações hepáticas e alterações no trato gastrointestinal também foram observadas mediante consumo da dieta de cafeteria na fase adulta (Cesaretti et al., 2006; Scoaris et al., 2010).

2.3. *Isquemia/Reperusão Mesentérica*

A isquemia ocorre quando um órgão não é suprido em quantidade suficiente de sangue, como resultado de choque, doença vascular ou transplante de órgãos. Os danos causados pelo processo de isquemia e reperusão (I/R) ocorrem inicialmente pela falta de circulação adequada para suprir as necessidades metabólicas dos órgãos envolvidos (Cerqueira et al., 2005; Chang et al., 2006). A isquemia mesentérica pode ser subdividida em crônica, quando os sintomas isquêmicos são provenientes de doença arteriosclerótica de longa data, e aguda, que é baseada na etiologia da oclusão, embólicas, trombóticas ou não oclusivas (Chang et al., 2006).

A isquemia mesentérica aguda é resultado de um decréscimo repentino no fluxo sanguíneo intestinal decorrente de uma oclusão vascular mesentérica, oclusão da artéria ou veia mesentérica superior, que gera uma hipoperfusão no intestino delgado podendo levar ao infarto, apresentando taxa de mortalidade de aproximadamente 70% (Tendler, 2003).

Em nível celular a isquemia causa danos funcionais nas mitocôndrias, redução de regulação da transferência iônica e acidez intracelular. Além disso, alterações na permeabilidade da membrana e liberação de enzimas degradativas e radicais livres que podem levar à apoptose e necrose tecidual (Chang et al., 2006).

Se a isquemia mesentérica é detectada precocemente, uma intervenção terapêutica é possível, caso contrário, técnicas cirúrgicas são necessárias, assim como na suspeita de infarto intestinal (Berland e Oldenburg, 2008). Estas medidas devem ser tomadas para reestabelecer os fluxos sanguíneos e evitar necrose tecidual e distúrbios metabólicos que podem culminar com disfunção do órgão e morte.

Entretanto, danos teciduais causados pela alteração do fluxo sanguíneo intestinal estão relacionados também com a reperusão (Bulkley, 2009) em condições clínicas como transplantes, cirurgias e diversos estados patológicos (Rivera et al., 2009). Curtos períodos de isquemia mesentérica resultam em aumento da permeabilidade microvascular, enquanto uma isquemia prolongada pode resultar em ruptura da barreira mucosa intestinal através principalmente de metabólitos de oxigênio reativo (Berland e Oldenburg, 2008) como radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila e neutrófilos polinucleares (Berland e Oldenburg, 2008; Sehirli et al., 2009).

O superóxido pode então formar peróxido de hidrogênio, e, secundariamente, o radical hidroxila pela reação de Harber-Weiss. As espécies reativas de oxigênio (ROS)

geradas a partir da I/R induzem a peroxidação lipídica nas membranas celulares e mitocondriais que é uma das causas de lesão na mucosa (Takizawa et al., 2011).

Em estudos de lesão mesentérica por I/R foram detectadas alterações na forma neural, no arranjo dos neurônios, na intensidade de coloração do plexo mioentérico (Bolekova et al., 2011), alteração de suas propriedades e até mesmo causa sua morte (Sehirli et al., 2009; Lindstro e Elblad, 2004). As alterações funcionais dos neurônios entéricos levam, então, à alterações na motilidade intestinal (Calcina et al., 2005; Lindstro e Elblad, 2004).



<http://hassylacarvalho.blogspot.com.br/2011/03/lesao-por-isquemia-reperfusao.html>

2.3. Envelhecimento

O processo de envelhecimento é uma característica única do ciclo de vida de todos os organismos multicelulares, no qual a capacidade funcional de uma variedade de sistemas fisiológicos sofrem prejuízos progressivos durante a fase pós-maturacional, atenuando a habilidade de manutenção da homeostase, resultando em morte (Sohal et al., 2002). Promove alterações morfoquantitativas na população neuronal e glial entérica (Phillips et al., 2004; Marese et al., 2007), na expressão de neurotransmissores (Phillips et al., 2003) e organização dos plexos, podendo levar a sintomas como redução do

tempo de esvaziamento gástrico e dos movimentos peristálticos, atividades moduladas pela inervação intrínseca do trato gastrointestinal (Wade & Cowen, 2004).

Apesar da redução quantitativa dos neurônios mioentéricos, pesquisas demonstram um aumento significativo da área do corpo celular, relacionado ao envelhecimento (Marese et al., 2007; Schoffen e Natali, 2007) que pode ser atribuído à reorganização dos neurônios remanescentes, demonstrando a capacidade plástica neuronal no tecido nervoso completamente diferenciado. Estas alterações estão relacionadas principalmente à produção de radicais livres e redução dos antioxidantes intracelulares provocando danos neuronais cumulativos e irreversíveis causando a morte celular por necrose ou apoptose (Imai e Nagakawa, 2003).

Para o estudo destas alterações, modelos de envelhecimento são utilizados em nosso laboratório. Os ratos são mantidos em biotério pelo tempo determinado para o experimento, com condições de temperatura e ciclo dia/noite de 12 horas controlados. Marese et al., 2007, utilizaram animais com 21, 60, 90, 210, 345 e 428 dias. Outro estudo em andamento (Santi-Rampazzo, AP), foram utilizados animais com 7, 12 e 23 meses de idade. Frequentemente, os modelos de envelhecimento são associados a outros que visam amenizar os prejuízos causados pela idade, como por exemplo, a suplementação dos animais com compostos antioxidantes ou restrição alimentar.

2.3. Antioxidantes

Neurônios são considerados particularmente vulneráveis aos danos causados pelo acúmulo de radicais livres devido ao seu grande tamanho, alto nível de atividade metabólica e relativamente pobre defesa antioxidante (Sohal e Weindruch, 1996). Várias espécies de radicais livres, denominadas espécies reativas ao oxigênio (ROS), são normalmente produzidas no corpo para realizar funções específicas. São geradas principalmente nas mitocôndrias durante o processo de respiração celular, apresentam elétrons desemparelhados, o que as torna altamente reativas para reagir com as demais substâncias biológicas do organismo (Kuyvenhoven e Meinders, 1999). O superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO) são três espécies reativas ao oxigênio que são essenciais para a fisiologia normal, mas que acredita-se que possam acelerar o processo de envelhecimento e mediar a degeneração celular em estados patológicos (Vincent et al., 2004).

O estresse oxidativo ocorre em um sistema celular quando a produção de moléculas de radicais livres excede sua capacidade antioxidante. Não ocorrendo a

remoção, os radicais livres atacam e danificam proteínas, lipídios e ácidos nucleicos diminuindo sua atividade levando à perda de metabolismo energético, sinalização celular, transporte e outras funções principais (Vincent et al., 2004). As substâncias antioxidantes, que permitem a manutenção do equilíbrio interno do organismo, impedindo a formação dos radicais livres ou neutralizando as espécies já formadas, sofrem redução durante o processo de envelhecimento ou patologias, favorecendo ainda mais a ocorrência do estresse oxidativo (Kuyvenhoven e Meinders, 1999).

Embora humanos e outros organismos possuam defesas antioxidantes e sistemas de reparos contra danos oxidativos, estes sistemas não são capazes de evitar todos os danos produzidos. No caso de um desbalanço dos mecanismos de proteção antioxidante, pode ocorrer uma deterioração das funções fisiológicas, resultando em doenças e aceleração do envelhecimento. Por esta razão, os antioxidantes em dietas e ou suplementos são de grande interesse como possíveis agentes protetores contra danos oxidativos (Peralta et al., 2008).

Pesquisas com antioxidantes têm sido freqüentes, e uma gama de compostos são utilizados para tal finalidade, podemos citar como exemplo: *Ginkgo biloba* (Da Silva et al., 2011), Vitaminas C (Freitas et al., 2008) e Vitamina E (Pereira et al., 2008), L-Glutamina (Pereira et al., 2011) e com extrato aquoso do cogumelo-do-sol, *Agaricus brasiliensis* (Antigo *A. blazei*), em andamento (Santi-Rampazzo, AP). Vale ressaltar que os modelos utilizados possuem particularidades em relação à tratamento e forma de administração do antioxidante estudado.

2.4. Fumonisina

Fumosinas são micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium*, com destaque para *F. verticillioides* que ocorre como contaminante de colheitas de milho em diversas partes do mundo. Grande interesse econômico e científico tem sido dado ao estudo das fumosinas devido à grande importância do milho como base alimentar para animais e para populações humanas. As fumosinas já foram confirmadas como causadoras de lesões aos sistemas nervoso, imunológico, cardiovascular e respiratório, ao fígado, os rins e como agente cancerígeno. Através de animais intoxicados em fazendas e de modelos experimentais, especialmente com uso de células em cultura, foi demonstrado que as fumosinas podem induzir a morte de diversos tipos de neurônios, como células do hipotálamo, córtex cerebral e neuroblastoma. Sabe-se também que as

fumosinas podem levar a morte e provocar alterações na produção de moduladores inflamatórios em células nervosas gliais.

Recentemente tem-se levantado evidências epidemiológicas e experimentais de que as fumosinas podem ter efeito teratogênico por induzirem defeitos no tubo neural. O intestino é também um alvo das fumosinas, uma vez que alguns estudos têm demonstrado efeitos deletérios tais como ruptura do metabolismo de esfingolipídios e alterações no tamanho das vilosidades e criptas intestinais, mas nenhum estudo abordou especificamente o sistema nervoso entérico. Neste estudo pretende-se avaliar os efeitos da alimentação com ração suplementada com fumosina sobre os neurônios e células gliais do plexo mioentérico. Para isto, 24 ratos Wistar, machos, adultos com 60 dias de vida serão alimentados por 60 dias com dietas variando apenas os níveis de fumosinas B1 (0; 2 e 6 mg/kg).

3. MÉTODOS DE EVIDENCIAÇÃO NEURONAL

3.1. Método de Giemsa

Os ribossomos são as organelas mais características do citoplasma neuronal, podendo estar ligados às cisternas do retículo endoplasmático rugoso ou arrançados em rosetas e espirais. A coloração neuronal pelo método de Giemsa adaptado por Barbosa (1978) explora a afinidade do corante de Giemsa, feito a base de azul de metileno, por estruturas ácidas como os ribossomos e retículo endoplasmático rugoso tão abundantes no citoplasma neuronal. Como o corante tem afinidade pela maquinaria de síntese proteica do neurônio, pode-se usar essa técnica para se fazer inferências indiretas sobre o estado da síntese de proteínas nos neurônios. As células em maior atividade de síntese proteica tenderão a apresentar maior afinidade pelo corante em relação àquelas com menor atividade de síntese proteica.

3.2. Métodos Histoquímicos

3.2.1. NADH e NADPH-DIAFORASE

NADH-DIAFORASE

Esta técnica baseia-se na atividade de enzimas mitocondriais capazes de transferir elétrons do NADH para aceptores de elétrons. Durante o funcionamento

normal das mitocôndrias o transporte de elétrons é acoplado às reações da fosforilação oxidativa para a síntese de ATP. Entretanto, para a marcação neuronal, segmentos do trato gastrointestinal são incubados em um meio contendo um doador de elétrons NADH e um aceptor artificial de elétrons conhecido como nitro blue tetrazolium (NBT) que quando reduzido se converte em um precipitado de cor púrpura chamado de formazana. Quando o tempo de incubação dos segmentos é limitado, por exemplo 45 minutos para todas as amostras, a quantidade de formazana produzida será proporcional a ação das enzimas mitocondriais transferidoras de elétrons dos neurônios das respectivas amostras. Assim, a técnica explora o funcionamento do metabolismo energético dos neurônios. Usando o mesmo tempo de incubação, aqueles neurônios com maior quantidade e/ou maior atividade das enzimas mitocondriais deverão exibir maior marcação em relação a neurônios com menor quantidade e/ou menor atividade das enzimas mitocondriais.

NADPH-DIAFORASE

Esta técnica baseia-se na atividade da enzima óxido nítrico sintetase neuronal, uma enzima que produz o neurotransmissor óxido nítrico à partir do aminoácido arginina. O óxido nítrico é um importante neurotransmissor inibitório no sistema nervoso entérico. Essa técnica permite o estudo da subpopulação de neurônios nitrérgicos entéricos. Para a marcação neuronal segmentos do trato gastrointestinal são incubados em um meio contendo um aceptor artificial de elétrons conhecido como nitro blue tetrazolium (NBT) e NADPH um doador de elétrons, então a enzima óxido nítrico sintetase neuronal se encarrega de transferir elétrons do NADPH para o NBT que quando reduzido se converte em um precipitado de cor púrpura chamado de formazana marcando de azul púrpura os neurônios.

3.3. Métodos Imunohistoquímicos

Métodos de coloração imunohistoquímica são amplamente utilizados atualmente. O reagente pivô, comum a todas as técnicas imunohistoquímicas é o **anticorpo**. Soluções contendo anticorpos (antisoros) específicos para um grande número de antígenos teciduais têm expandido a quantidade e qualidade do repertório imunohistológico.

Para a melhor compreensão dos métodos imunohistoquímicos, é necessário um conhecimento básico de alguns princípios de imunologia.

1. Antígenos

Apresentam duas propriedades fundamentais: a primeira é a **imunogenicidade**, que é a capacidade de induzir a formação de anticorpos, e a segunda é a **reatividade específica**, o que significa que o antígeno é capaz de reagir com o anticorpo que por ele foi induzido. A reação entre um antígeno e seu anticorpo é uma das mais específicas em toda a biologia, e é a razão pela qual as reações imunohistoquímicas são mais precisas do que as técnicas de histoquímica de rotina.

Um antígeno é, então, uma substância estranha ao hospedeiro, que estimula a formação de um anticorpo específico e que reagirá com este anticorpo produzido. Esta reação envolve a formação de complexos imunes compostos por diversas moléculas de antígenos e anticorpos. Estes complexos podem se tornar muito grandes e formar precipitados que podem ser caracterizados por diversas técnicas.

1. Anticorpos

Um anticorpo é formado em resposta à exposição a um antígeno e reage especificamente com este antígeno, formando imunocomplexos, quer no próprio organismo, ou em condições laboratoriais. Pertencem a um grupo de proteínas chamadas imunoglobulinas (Ig). Compreendem cinco maiores classes, listadas em ordem decrescente de quantidade encontrada no plasma ou soro: imunoglobulina G (IgG), IgA, IgM, IgD e IgE. Cada imunoglobulina é composta de duas **cadeias pesadas** (H) idênticas e duas **cadeias leves** (L) também idênticas. Soluções de anticorpos utilizadas em colorações imunohistoquímicas contém principalmente anticorpos da classe IgG, com menores quantidades das demais classes

2. Tipos de soluções contendo anticorpos

Existem diversos preparados contendo anticorpos, adequados para a utilização nas técnicas de imunohistoquímica.

SORO TOTAL:

- Produção mais simples, e por isso o mais comum e mais barato. O soro de um animal contendo um anticorpo é centrifugado com o objetivo de separar as células do soro, e qualquer anticorpo contaminante é retirado mediante absorção.
- Contém anticorpos específicos contra o antígeno com o qual o animal foi imunizado, mas também contém anticorpos que são o produto do funcionamento

normal do sistema imune do animal. Estes não deverão interferir com os procedimentos de coloração. A maioria das frações do soro total é constituída de componentes séricos como enzimas, eletrólitos e proteínas.

FRAÇÃO COM ANTICORPOS:

- Esta solução contém principalmente anticorpos, quer sejam específicos contra o antígeno desejado, mas também os de ocorrência natural, além de uma quantidade muito pequena de proteína sérica residual. Neste tipo de preparação, purifica-se apenas a fração de imunoglobulina. A remoção da grande maioria das proteínas reduzirá a chance de reações inespecíficas em várias técnicas.

PREPARADO ANTIGENO-ANTICORPO ESPECÍFICO:

- É uma solução contendo somente anticorpos dirigidos contra um antígeno específico. Não é obtido comumente e apresenta especificidade superior à necessária para a maioria dos procedimentos.

PREPARADO COM ANTICORPO CONJUGADO:

- Neste caso, a solução contém o anticorpo específico, ligado quimicamente a um determinado tipo de marcador. Este marcador pode ser fluorescente (fluoresceína e rodamina) ou uma enzima (fosfatase alcalina e peroxidase). Infelizmente, no processo químico da conjugação, pequenas quantidades de anticorpos e de marcadores podem ser destruídos. Isto pode reduzir a especificidade destes reagentes. Uma alternativa então, é a utilização de **imunocomplexos** que constituem a combinação de um antígeno e seu anticorpo específico, utilizando-se a afinidade natural que estas moléculas tem entre si. Estes complexos são especialmente preparados de forma a se manterem solúveis e não formarem precipitados nas soluções (ex: complexo peroxidase-antiperoxidase – PAP, que consiste da enzima peroxidase (antígeno) e um anticorpo específico para a antiperoxidase).

3. ANTICORPOS MONOCLONAIS E POLICLONAIS

Epitopo ou Determinante antigênico= é a parte estrutural de um antígeno que reage com um anticorpo.

Monoclonais: São anticorpos produzidos por uma linhagem específicos de células B (clone), portanto imuno e quimicamente idênticos, e que agem sobre um epitopo em especial, localizado sobre o antígeno contra o qual eles são dirigidos.

Policlonais: São produzidos por diferentes células B e, em consequência, são imuno e quimicamente distintos. Eles reagem com vários epitopos de um antígenos contra o qual são dirigidos.

4. REAÇÃO CRUZADA DOS ANTICORPOS

A reação cruzada de um anticorpo geralmente denota sua interação específica com um epitopo idêntico, encontrado em duas ou mais moléculas diferentes de antígenos.

6. DILUIÇÕES E INCUBAÇÃO

Usualmente, o fabricante oferece produtos pré-diluídos para o uso, ou recomenda diluições que sejam compatíveis com outras variáveis, tais como o método, tempo de incubação e temperatura. Diluições corretas irão contribuir para a qualidade da coloração, se elas forem preparadas cuidadosamente e consistentemente. São melhores determinadas, selecionando-se primeiro, um tempo de incubação fixo, e depois realizando uma série de diluições experimentais, com pequenos volumes.

A coloração alcançada pelo uso de diferentes diluições será freqüentemente idêntica ou semelhante. Neste caso, o custo do reagente pode vir a ser um fator importante na escolha da diluição ideal.

Incubações:

Tempo de incubação: a maior concentração de anticorpos específicos (e maior afinidade) permite um menor tempo de incubação.

O tempo de incubação para o anticorpo primário pode variar de 1,5 minutos a 48 horas, sendo de 20-30 minutos, o tempo mais usado. Incubações do anticorpo primário por 48 horas permitem, mais do que qualquer coisa, uma grande economia, porque diluições muito altas de antisoro podem ser usadas. O equilíbrio normalmente não é alcançado antes de 20 minutos. Tempos de incubação inconsistentes podem causar variações na intensidade e qualidade total da coloração.

Temperatura de incubação: o equilíbrio nas reações antígeno-anticorpo é alcançado mais rapidamente a 37°C, em comparação com a temperatura ambiente. Por isso muitos pesquisadores preferem incubar em temperatura maior. Um aumento na temperatura de incubação permite uma maior diluição do anticorpo. Se a diluição não é aumentada, o tempo de incubação pode ser menor.

Metodos de Coloração

Existem muitos métodos imunoenzimáticos que pode ser usados para localizar antígenos. A escolha é baseada nas necessidades individuais de cada laboratório, tais como o tipo de espécimen a ser investigada, o grau de sensibilidade necessária, o tempo de processamento e o custo.

Método Direto

Nesta técnica, um anticorpo primário é quimicamente ligado a uma enzima (anticorpo conjugado). O anticorpo conjugado é a seguir incubado com a amostra de tecido e reagirá com o antígeno. A subsequente aplicação de um substrato cromogênico implicará na produção de um produto final colorido que se precipitará no local, revelando desta forma, a presença do antígeno.

Método Indireto (dois passos)

Neste método um anticorpo primário não conjugado se liga ao antígeno. Um anticorpo secundário, marcado com uma enzima, é aplicado contra o anticorpo primário (agora considerado o antígeno), seguido pela solução do substrato cromógeno.

Este método é mais versátil do que o método direto porque uma variedade de anticorpos primários a partir da mesma espécie, podem ser usados com o mesmo anticorpo secundário marcado. O procedimento é também algumas vezes mais sensível que o método direto, porque alguns anticorpos secundários parecem reagir com diferentes epitopos localizados no anticorpo primário. Como consequência disto, mais moléculas de enzima se ligam no sítio do antígeno, o que resulta na maior sensibilidade.

Método Indireto (três passos)

Neste método, um segundo anticorpo conjugado com enzima é adicionado ao previamente descrito. O anticorpo primário e o anticorpo secundário conjugado são

aplicados sequencialmente, seguidos por um **terceiro anticorpo** conjugado com enzima, específico para o anticorpo secundário.

A terceira camada de anticorpo tem a função de amplificar o sinal. A enzima adicional colocada no sítio do antígeno produz uma maior intensidade de coloração. A amplificação do sinal é particularmente importante quando os antígenos tem um número limitado de epitopos.

Coloração Inespecífica de Fundo

É a coloração positiva, em determinada amostra, que não resulte de interação antígeno-anticorpo.

A causa mais comum é a ligação de proteínas aos elementos de tecido conjuntivo e colágeno com fortes cargas elétricas. Os anticorpos são proteínas. Caso a primeira solução de proteínas aplicadas ao tecido seja o anticorpo primário, este pode ser inespecificamente absorvido nestes locais com intensas cargas elétricas. O anticorpo secundário vindo a seguir liga-se ao primário, e desta forma, ocorrerá a reação de coloração. A coloração positiva destes locais deve-se não à existência de antígeno nos tecidos, mas à ligação inespecífica de anticorpos ao colágeno no tecido conjuntivo.

Como evitar: através da adição de uma solução de proteína inóqua à amostra, antes da aplicação do anticorpo primário. Esta proteína preencherá estes componentes teciduais ricos em cargas elétricas, não deixando espaço para a absorção inespecífica do anticorpo primário. A fonte mais comum de solução protéica utilizada para esta finalidade é o **soro não-imune** da mesma espécie animal que produziu o anticorpo secundário. Este cuidado permite a prevenção da coloração falso-positiva devido à ligação do anticorpo secundário com componentes na solução protéica.

A adição de **albumina do soro bovino (BSA)** 2-5% aumentará a concentração de proteínas e reduzirá ainda mais a coloração inespecífica. O soro não imune é aplicado à amostra tecidual por 10 a 20 minutos. Esta etapa não é seguida por uma lavagem, mas o soro em excesso é apenas escoado, permanecendo uma delgada camada envolvendo o tecido quando da aplicação do anticorpo primário. É necessário que permaneça uma quantidade pequena do soro, caso contrário o anticorpo primário será significativamente diluído, resultando em redução da intensidade de coloração do antígeno em pesquisa.

4. PROTOCOLOS

4.1. Giemsa

- 1 – Lavagem do segmento em solução salina.
- 2 – Preenchimento do volume intestinal e imersão em solução fixadora de Giemsa por, no mínimo, 24 horas.
- 3 – Microdissecação sob estereomicroscópio com trans-iluminação, retirando-se as túnicas mucosa e submucosa e preservando-se as túnicas muscular externa e serosa.
- 4 – Coloração pelo corante de Giemsa, à base de azul de metileno, em tampão fosfato de Sorensen 0,1 N (pH 6,9), durante 24 horas, à temperatura ambiente.
- 5 – Desidratação em série de concentrações crescentes de álcoois.
- 6 – Diafanização através da passagem em xilol.
- 7 – Montagem do preparado de membrana entre lâmina e lamínula com resina sintética Permunt.

4.2. Azul cuprolínico

Coleta: Lavar os segmentos removidos em PBS, fazer bexiga com paraformaldeído 4% pH 7.4 e deixar nesta solução por 2 horas. Após este período, abrir a bexiga, lavar 2X em PBS e armazenar na geladeira em PBS+ azida sódica 0.04% enquanto aguarda dissecação.

- 1) Lavar os preparados de membrana 3 X (5 minutos cada) com **água destilada**;
 - 2) Lavar os preparados de membrana 2X (5 minutos cada) com **Tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,6**;
 - 3) Incubar cada membrana em Meio N°1:
5 ml de Tampão acetato de sódio 0,05 M p.H. 5,6 + 100 µl de solução saturada (33 %) $K_3 Fe(CN)_6$ -[Ferricianeto de Potássio] em água destilada, por 30 minutos a temperatura ambiente;
 - 4) Lavagem 3 X 1 minuto cada com **água destilada**;
 - 5) Incubar cada membrana em Meio N°2:
5 ml de Tampão acetato de sódio 0,05 M p.H. 5,6 + 1M Mg Cl₂, 15 µl de Triton X-100 (concentração final 0,3%) e 5 µl de DMSO-[Dimetilsulfóxido-(CH₃)₂SO] (concentração final 0,1%)- 10 minutos a temperatura ambiente;
 - 6) Colocar os preparados em papel filtro para secar;
- *OBS:* A partir deste momento não usar instrumento de metal;

7) Incubar cada membrana em Meio N°3:

5 ml de Tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,6

0,025g de Azul Cuprolínico

1,017g de MgCl₂

*Este meio terá o pH final de 4,9. (já está pronto, é o corante)

*Colocar os preparados nesse meio em tubos de vidro (5ml) ou em eppendorf (1ml);

8) Colocar em posição padrão no **microondas** (de acordo com Ginneken et al, 1999);

9) Irradiação de 90W por 5 minutos (testar o microondas antes pois a temperatura não pode passar de 45°C que enrugam a membrana)

10) Deixar no microondas desligado por 15 minutos;

11) Colocar os preparados no **Tampão acetato de sódio 0,05 M p.H.5,6 enriquecido com 1M MgCl₂** por 2 minutos;

12) Lavar 3 X 5 minutos cada com PBS.

13) Montagem em glicerol

SOLUÇÕES

TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 0,05 M pH 5,6 :

PARA 1 LITRO:

4,14 g de acetato de sódio;

0,41 ML de ácido acético;

Completar com água destilada;

Manter na geladeira.

SOLUÇÃO SATURADA DE K₃Fe(CN)₆:

10 ML de água destilada

3,3 g de K₃Fe(CN)₆

Aquecer até 50°C.

TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 0,05 M pH 5,6+ CLORETO DE MAGNÉSIO 1M

50 ML de Tampão acetato de sódio 0,05M pH5.6

10,165 g MgCl₂

Envolver em papel alumínio.

PBS 0,1 M pH 7,4 + Azida Sódica 0,04%:

2g de Ázida sódica + 5 litros de PBS.

4.3. *NADH-DIAFORASE e NADPH-DIAFORASE*

NADH-DIAFORASE

- 1 – Lavagem e preenchimento da luz intestinal com solução tampão de Krebs, por 20 minutos, à temperatura ambiente.
- 2 – Imersão em solução de Krebs, por 20 minutos.
- 3 – Imersão, por 5 minutos, em solução de Triton-X 100, a 0,3% em solução de Krebs.
- 4 – Lavagem em solução de Krebs por 10 minutos.
- 5 – Incubação por 45 minutos em 100 mL de solução contendo: 25 mL de solução de nitro blue tetrazolium (NBT) a 0,5 mg/mL em água destilada; 25 mL tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,3; 50 mL de água destilada e 0,5 mg/mL de beta-NADH.
- 6 – Interrupção da reação com formol tamponado a 10% e fixação com a mesma solução.
- 7 – Microdissecação sob estereomicroscópio com trans-iluminação, retirando-se as túnicas mucosa e submucosa e preservando-se as túnicas muscular externa e serosa.
- 8 – Desidratação em série de concentrações crescentes de álcoois.
- 9 – Diafanização através da passagem em xilol.
- 10 – Montagem do preparado de membrana entre lâmina e lamínula com resina sintética Permount.

NADPH-DIAFORASE

- 1 – Lavagem e preenchimento da luz intestinal com solução tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M pH 7,4.
- 2 – Fixação por imersão em solução de paraformaldeído 4% dissolvido em PBS 0,1M pH 7,4 por 10 minutos.
- 3 – Lavagem em solução de PBS 0,1M pH 7,4 por 10 vezes de 10 minutos cada.
- 4 – Incubação por duas horas em solução contendo para cada 100 mL: 25 mg NBT, 50 mg beta-NADPH, Triton-X 100 0,3% em tampão Tris-HCl 0,1M pH 6,0.
- 5 – Lavagem em solução de PBS 0,1M pH 7,4 por 3 vezes de 5 minutos cada.
- 6 – Imersão em solução de paraformaldeído a 4%.
- 7 – Microdissecação sob estereomicroscópio com trans-iluminação, retirando-se as túnicas mucosa e submucosa e preservando-se as túnicas muscular externa e serosa.
- 8 – Desidratação em série de concentrações crescentes de álcoois.
- 9 – Diafanização através da passagem em xilol.

10 – Montagem do preparado de membrana entre lâmina e lamínula com resina sintética Permout.

4.4. *Imunohistoquímica*

Coleta de Material:

Retirar o segmento de interesse

Lavagem do segmento – PBS

Fixação: Paraformaldeído - 3 hs

Lavagem do material com PBS – (2x 10 min)

Manter o material no PBS com azida sódica para posterior dissecação.

Dissecação

Após a dissecação, manter as membranas em PBS com azida. Realizar a primeira lavagem (2x 500 uL por 5 min) em PBS + Triton

Bloqueio

Preparar a solução de bloqueio e manter as membranas por uma hora.

Solução: PBS + azida + triton + soro de cabra + BSA

Anticorpo Primário:

Incubar em anticorpo primário por 48hs.

Solução: PBS + azida + triton + soro de cabra + BSA + anticorpo 1°

Anticorpo Secundário:

Realizar a segunda lavagem – (3x 500 uL por 5 min) em PBS + triton

Adicionar a solução contendo o anticorpo secundário. Incubar por 2hs.

Solução: PBS + azida + triton + soro de cabra + BSA + anticorpo 2°

Montagem das lâminas:

Após a terceira lavagem – (3x 500 uL por 5 min)

5. ESTUDO MORFOQUANTITATIVO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a realização do experimento, que envolve as etapas de tratamento, eutanásia e realização das técnicas descritas acima, faz-se necessário determinar as melhores estratégias de obtenção dos dados e análises dos mesmos. Duas categorias de

análise são extensivamente utilizadas: *Análise quantitativa*, que fornece informações de densidade ou número de células/gânglio e *análise morfológica*, que se refere à medida do perfil neuronal ou glial, ou seja, a área média do corpo celular.

Em primeiro lugar, é interessante determinar a região do segmento que está sendo estudado. Para isso, é realizada uma divisão didática considerando a circunferência intestinal (Figura 1.A). Após seccionado na região mesentérica, o preparado de membrana apresenta duas regiões mesentéricas (M - mais externas), uma região antimesentérica (AM – mais central) e duas regiões intermediárias (I), que se intercalam entre M e AM (Figura 1.B). Estas regiões podem ser determinadas nas lâminas com auxílio de uma régua e canetas para retroprojetor.

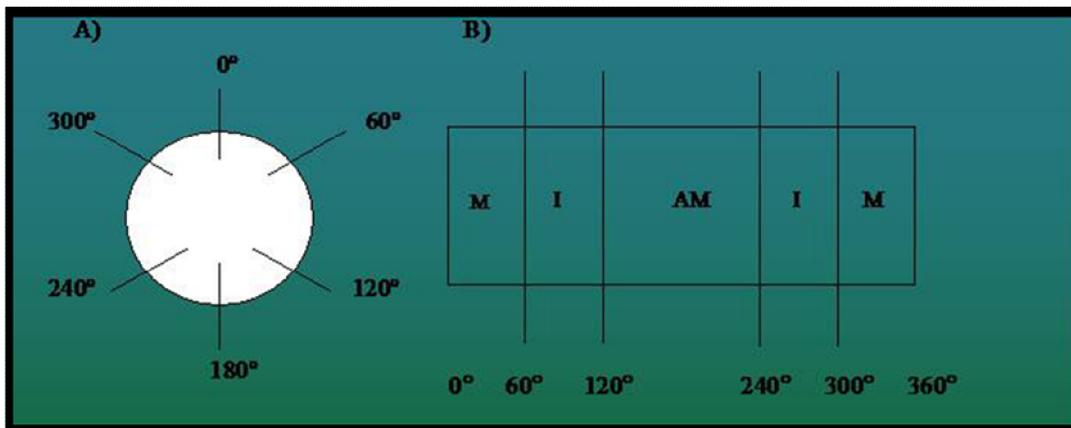


Figura 1. Divisão didática da circunferência intestinal.

A quantificação neuronal por densidade se baseia na contagem ou captura de imagens em campos aleatórios dentro da região (ou regiões) escolhida para estudo. Quando a objetiva utilizada para análise é de 20X, utiliza-se 32 campos microscópicos, geralmente em capturas de imagens nas lâminas de imunofluorescência. Para a contagem direta no microscópio utiliza-se objetiva de 40X e 80 campos microscópicos (este número pode variar dependendo da pesquisa que está sendo realizada). Pode-se realizar a análise em apenas uma região (I ou AM), ou dividir a quantidade de imagens abrangendo ambas regiões, o importante é seguir um padrão para todos os animais. A região mesentérica (M) é pouco utilizada por sofrer injúrias durante o processamento, tornando a visualização celular mais complexa. Após a captura das imagens realiza-se a contagem de todos os neurônios, obtendo-se uma soma que, juntamente com a soma da área analisada, será convertida em neurônios/cm², neurônios/mm² ou neurônios/área total analisada.

Para a quantificação por gânglio, realiza-se a captura e contagem de 50 gânglios aleatórios/animal e os valores são expressos como neurônios/gânglio e/ou glias/gânglio. No caso de dupla-imunomarcção para neurônios e células da glia, os resultados podem ainda ser expressos como relação glia/neurônio.

Para a análise morfométrica são mensuradas áreas (μm^2) dos corpos celulares de 100 neurônios ou células glias/animal por meio do programa Image-Pro Plus versão 4.5-Media Cybernetics.

Análises estatísticas

Os dados devem ser analisados quanto à sua distribuição (normalidade) através do teste Kolmogorov-Smirnov (KS). Dados paramétricos são submetidos à Análise de Variância (*one-way* ANOVA) e o pós teste de Tukey com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism[®] 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Dados não-paramétricos são analisados por delineamento em blocos com o programa Statistica (StatSoft). O nível de significância adotado é de 5% e os resultados podem ser expressos como média \pm desvio padrão ou média \pm erro padrão.

REFERÊNCIAS

AUBÉ, AC; CABARROCAS, J; BAUER, J. Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. **Gut**; 55: 630-637, 2006.

BARBOSA, AJA. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. **Rev. Bras. de Pesquisas Méd. e Biol.** 11:95-97, 1978.

BARJA, G. Endogenous oxidative stress: relationship to aging, longevity and caloric restriction. **Ageing Research Reviews**; 1: 397-411, 2002.

BARJA, G. Free radicals and aging. **Trends in Neurosciences**; 27: 595-600, 2004.

BENNET, JW. Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and Mycopathologia. **Mycopathologia**, 100:3-5, 1987.

BERGMEYER, HU; BERNET, E. Determination of glucose-oxidase and peroxidase. In: **Methods of enzymatic analysis**. New York, NY: Verlag Chemie-Academic Press, 1974.

BERLAND, T; OLDENBURG, WA. Acute mesenteric ischemia. **Curr Gastroenterol Rep. USA**; 10: 341-346, 2008.

BEZUIDENHOUT, SC; GELDERBLOM, WCA.; GORST-ALLMAN, CP. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society**, 743-745, 1988.

BOKOV, A; CHAUDHURI, A; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, 125: 811-826, 2004.

BOLEKOVA, A. et al. NADPH-diaphorase expression in the rat jejunum after intestinal ischemia/reperfusion. **Eur. J. Histochem**; 55: 23, 2011.

BOLZAN, AD; BIANCHI, MS. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutat. Res**; 512: 121-134, 2002.

BORDONE, L; GUARENTE, L. Calorie restriction, sirt 1 and metabolism: understanding longevity. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**; 6: 298-305, 2005.

BULKLEY, GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. **Br J Cancer Suppl**; 8: 66-73, 1987.

CALCINA, F., et al. Effect of N-methyl-D-aspartate receptor blockade on neuronal plasticity and gastrointestinal transit delay induced by ischemia/reperfusion in rats. **Neuroscience**;134: 39-49, 2005.

CERQUEIRA, NF; HUSSNI, CA; YOSHIDA, WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. **Acta Cir Bras. Brazil**, 20: 336-43, 2005.

CESARETTI, MLR, et al. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 50:8, 2006.

CHANDRASEKHARAN, B; SRINIVASAN, S. Diabetes and the enteric nervous system. **Neurogastroenterol Motil**, 19: 951-60, 2007.

CHANG, RW; CHANG, JB; LONGO, WE. Update in management of mesenteric ischemia. **World J Gastroenterol**, 12: 3243-3247, 2006.

COSTA, M; BROOKES SJH; HENNIG, GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, 47:15-19, 2000.

COWEN, T; JOHNSON, RJ; SOUBEYRE, V; SANTER, RM. Restricted diet rescues rat enteric motor neurons from age related cell death. **Gut**, 47: 653-660, 2000.

DA SILVA, GGP; ZANONI, JN; BUTTOW, NC. Neuroprotective action of Ginkgo biloba on the enteric nervous systems of diabetics rats. **World J Gastroenterology**, 17: 898-905, 2011.

DE FREITAS, P; NATALI, MR; PEREIRA, RV; MIRANDA NETO, MH, ZANONI, JN. Myenteric neurons and intestinal mucosa of diabetic rats after ascorbic acid supplementation. **World J Gastroenterology**, 14: 6518-24, 2008.

FURNESS, JB. The Enteric Nervous System. New York: Churchill Livingstone, 2005.

FURNESS, JB; KUNZE, WA; CLERC, N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. **Am J Physiol**, 277: 922-8, 1999.

FURNESS, JB; YOUNG, HM; POMPOLO, S; BORNSTEIN, JC; KUNZE, W.A.A., MCCONALOGUE, K. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. **Gastroenterology**, 108: 554- 563, 1995.

GABELLA, G. Detection of nerve cells by histochemical technique. **Experimentia**, 25:218-219, 1969.

GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **Journal of Anatomy**, 109:81-94, 1971.

GABELLA, G. Inervation of the gastrointestinal tract. **International Review of Cytology**, 59: 129-193, 1979.

GABELLA, G. Fall in the number of myenteric neurons aging guinea pigs. **Gastroenterology**, 96: 1487-1493, 1989.

GARTNER, LP; HIATT, JL. Tratado de histologia em cores, 2º edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GRUNDY, D; SCHEMANN, M. Enteric nervous system. **Curr Opin Gastroenterol** 21:176-182, 2005.

GREDILLA, R; BARJA, G. Minireview: The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. **Endocrinology**, 146: 3713-17, 2005.

IMAI, H; NAGAKAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 34: 145-169, 2003.

JOHNSON, RJR; SCHEMANN, M; SANTER, RM; COWEN, T. The effects of age on the overall population and on sub-populations of myenteric neurons in the rat small intestine. **Journal of Anatomy**, 192: 479-488, 1998.

JUNQUEIRA, LCU; CARNEIRO, JC. *Histologia Básica*, 11ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

KANASAKI, K; KOYA, D. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. **J Biomed Biotechnol**, p.1-11, 2011.

KUYVENHOVEN, JP; MEINDERS, AE. Oxidative stress and diabetes mellitus – Pathogenesis of long-term complications. **European Journal of Internal Medicine**. 10: 9-19, 1999.

LINDESTRO, LM; EKBLAD, E. Structural and Neuronal Changes in Rat Ileum After Ischemia with Reperfusion. **Digestive Diseases and Sciences**, 49: 1212–22, 2004.

MARESE, ACM; FREITAS, P; NATALI, MRM. Alterations of the number and the profile of myenteric neurons of Wistar rats promoted by age. **Neurosci Basic Clin** 2007.

MATTSON, MP; DUAN, W; GUO, Z. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease cellular and molecular mechanisms. **Journal of Neurochemistry**, 84: 417-431, 2003.

MIRANDA-NETO, M.H.; MOLINARI, S.L.; NATALI, M.R.M. et al. Regional differences in the number and type of myenteric neurons of the ileum of rats. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, 59:54-59, 2001.

PERALTA, RM; OLIVEIRA, AL; ELER, GJ; SOARES, AA; BRACHT,A. Functional properties of edible and medicinal mushrooms. **Current Trends in Microbiolog**, 4: 45-60, 2008.

PEREIRA, RV; MIRANDA-NETO, MH; SOUZA, IDS; ZANONI, JN. Vitamin E supplementation in rats with experimental diabetes mellitus: analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neuron from terminal ileum. **J Mol Hist**, 2008.

PEREIRA, RV; TRONCHINI, EA; TASHIMA, CM; ALVES, EP; LIMA, MM; ZANONI, JN. L-glutamine supplementation prevents myenteric neuron loss and has gliatrophic effects in the ileum of diabetic rats. **Dig Dis Sci**, 56: 3507-16, 2011.

PHILLIPS, RJ; KIEFFER, EJ; POWLEY, TL. Loss of glia and neurons in the myenteric plexus of the aged Fischer 344 rat. **Anat. Embryol**, 209: 19-30, 2004.

REES, DA; ALCOLADO, JC. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Med**, 22: 359-370, 2005.

RIVERA, LN. et al. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea pig enteric nervous system. **Acta Neuropathol.**, 118: 261-270, 2009.

RUHL, A; NASSER, Y; SHARKEY, KA. Enteric glia. **Neurogastroenterol Motil**; 16: 44-49, 2004.

SCHOFFEN; JPF; NATALI; MRM. Effect of age on the myosin-V immunoreactive myenteric neurons of rats ileum. **Biocell**; 31: 33-39, 2007.

SCOARIS, CR, et al. Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. **Nutrition**, 26 : 312-20, 2010.

SEHIRLI, AO; SENER, G; ERCAN, F. Protective Effects of Pycnogenol against Ischemia Reperfusion-Induced Oxidative Renal Injury in Rats. **Renal Failure**. 31: 690-697, 2009.

SOHAL, RS; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, 273: 59-63, 1996.

SOUSA, FC; MIRANDA-NETO, MH. Morphometric and quantitative study of the myenteric neurons of the stomach of malnourished aging rats. **Nutritional Neuroscience**, 12(4):167-174, 2009.

TAKIZAWA, Y. et al. Effects of antioxidants on drug absorption in vivo intestinal ischemia/reperfusion. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, 35: 89-95, 2011.

TENDLER, DA. Acute intestinal ischemia and infarction. **Semin Gastrointest Dis**. 14: 66-76, 2003.

THRASIVOULOU, C; SOUBEYRE, V; RIDHA, H; GIULIANI, D; GIARONI, C; MICHAEL, GJ; SAFFREY, MJ; COWEN, T. Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. **Aging Cell**, 5: 247-257, 2006.

VINCENT, AM; RUSSEL, JW; LOW, P; FELDMAN, EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Endocrine Reviews**, 25: 612-628, 2004.

VOET, D; VOET, J; PRATT, CW. Fundamentos de Bioquímica. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2002.

WACHSMAN, JT. The beneficial effects of dietary restriction: reduced oxidative damage and enhanced apoptosis. **Mutation Research**, 350: 25-34, 1996.

WADE, PR; COWEN, T. Neurodegeneration: a key factor in the ageing gut. **Neurogastroenterol. Motil**, 16: 19-23, 2004.

XIANG, FL. et al. NOX2 Deficiency protects against streptozotocin-Induced β -cell destruction and development of diabetes in mice. **Diabetes**, 50: 2603-11, 2010.

ZHANG, Y; HERMAN, B. Ageing and apoptosis. Mechanisms **of Ageing and Development**, 123: 245-260, 2002.

INTRODUÇÃO A CITOGENÉTICA DE PEIXES

Prof^a Ana Luiza de Brito Portela Castro
Prof^a Ana Camila Prizon
Prof^o Lucas Baumgartner
Prof^o Marcos Otávio Ribeiro

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a biologia dos peixes quando comparado com outros grupos de vertebrados é pouco conhecida, notadamente sobre a evolução, sistemática e distribuição de muitos grupos neotropicais. Possivelmente, uma das principais razões para essa carência seja o elevado número de espécies - cerca de 24.600 - o que equivale, aproximadamente, ao número de espécies de todos os demais vertebrados (NELSON, 2006).

A grande diversidade de ambientes ecológicos existentes na América do Sul permitiu uma grande irradiação evolutiva, possuindo hoje esta região uma ictiofauna muito rica, contendo cerca de 60 famílias e, aproximadamente 2800 espécies conhecidas (SCHAEFFER, 1998). Entretanto, estima-se que existam cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais. Essa fauna extremamente complexa é do ponto de vista evolutivo, um grande produto do mundo biológico.

Nas duas últimas décadas a Citogenética vem contribuindo significativamente para um melhor conhecimento da biodiversidade em peixes neotropicais, apresentando uma somatória de informações e descobertas relativas a processos evolutivos nesse grupo, tais como rearranjos cromossômicos, polimorfismos estruturais e/ou numéricos, poliploidia natural, sistemas de cromossomos sexuais, distribuição geográfica de espécies/populações. Hoje, estima-se que existam disponíveis para a citogenética, 475 espécies de Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes, 199 espécies de água doce, não pertencem a superordem Ostariophysi e apenas 109 espécies de água salgada. (OLIVEIRA et al, 2009). Entretanto, importantes subsídios têm sido fornecidos para um melhor entendimento das relações evolutivas entre espécies e populações, assim como para a caracterização de complexos de espécies, em associação com dados de morfologia, biogeografia, comportamento e biologia molecular (ARTONI et al., 2000).

A associação entre a Citogenética e a Sistemática, tem se mostrado, em muitos casos, extremamente importante, complementando os estudos de identificação, distribuição e de relacionamento entre grupos naturais, normalmente baseados apenas em caracteres morfométricos e merísticos. Além disso, o conhecimento da estrutura dos cromossomos, através de mapeamento de sequências gênicas utilizando técnicas de FISH (Hibridação fluoescnte “*in situ*”) aplicados em diferentes grupos de peixes tem contribuído grandemente para o conhecimento do genoma dessa classe de vertebrados e suas implicações evolutivas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterização citogenética de peixes com base no cariótipo, bem como de técnicas de bandamentos cromossômicos usuais (AgNOR e C).

Objetivos específicos

- Obter cromossomos mitóticos através da técnica de suspensão celular.
- Caracterizar a morfologia cromossômica da espécie alvo.
- Empregar as técnicas de bandamento cromossômico como distribuição das regiões de heterocromatina constitutiva (banda C) e regiões organizadoras de nucléolos (Ag-NORs).
- Conhecer as técnicas de citogenética molecular como Hibridação Fluorescente “*in situ*” (FISH) e suas aplicações.

MATERIAS E MÉTODOS

1. Análises citogenéticas

As análises citogenéticas de cromossomos mitóticos serão feitas com base em técnicas convencionais e de bandamentos cromossômicos.

2. Estimulação de mitoses:

Para obtenção de um maior número de mitoses, será utilizada uma técnica de estimulação celular através da injeção de uma solução de fermento biológico, descrita inicialmente por Cole e Leavens (1971) para anfíbios e répteis, utilizada por Lee e Elder

(1980) para pequenos mamíferos e por Oliveira et al. (1988) para peixes. O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada.
2. Incubar a solução em banho-maria (40°C) por cerca de 20 minutos.
3. Injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal.
4. Deixar o animal em aquário bem aerado por 48 ou 72 horas.

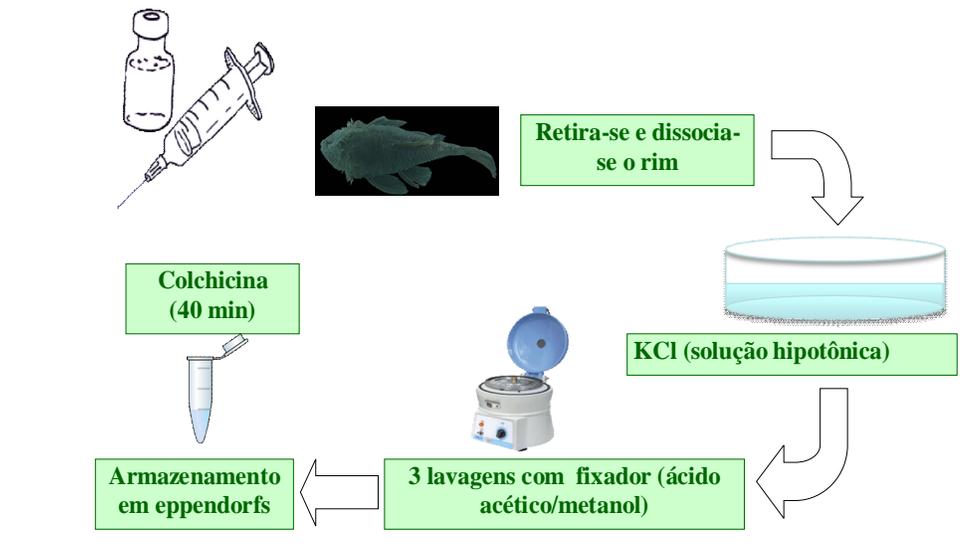
3. Preparação de Cromossomos Mitóticos:

As preparações do material, para análise dos cromossomos mitóticos, serão feitas utilizando-se a porção cefálica do rim, de acordo com a técnica “air drying” descrita por Egozcue (1971) e modificada para peixe por Bertollo (1978).

4. Técnica “Air Drying” (BERTOLLO *et al.*, 1978):

Injetar intraperitonealmente solução aquosa de colchicina (0,0025%) na proporção de 1 ml/100g do peso do animal; Deixar o peixe em aquário bem aerado por 30 a 60 minutos, sacrificando-o e retirando os órgãos desejados; hipotonizar o tecido em solução de KCl (0,075) e fixar em fixador (3 partes de álcool metílico: 1 parte de ácido acético). Após obter uma suspensão celular, pingar 3 a 4 gotas em uma lâmina e deixar secar. As lâminas com a suspensão celular serão coradas com Giemsa diluído a 5% em tampão fosfato pH 6,8, durante 5 minutos, para análise convencional e submetidas a diferentes tratamentos de bandeamentos cromossômicos.

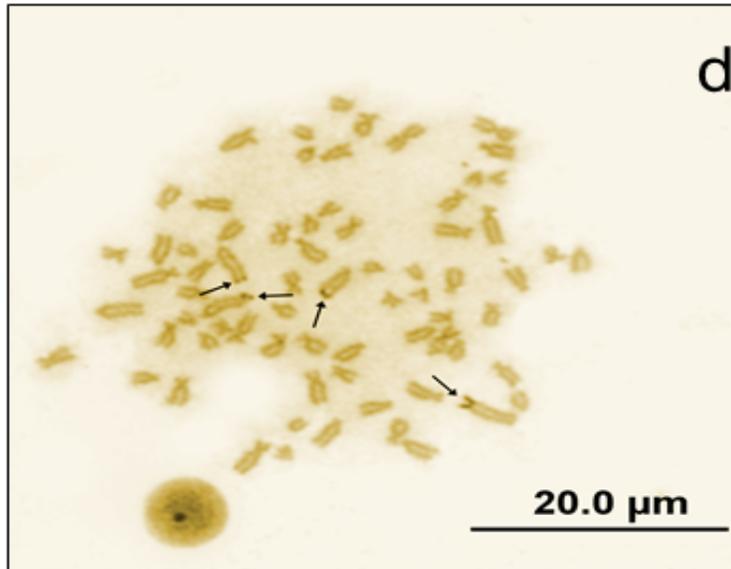
Processamento do material



5. Bandeamentos Cromossômicos:

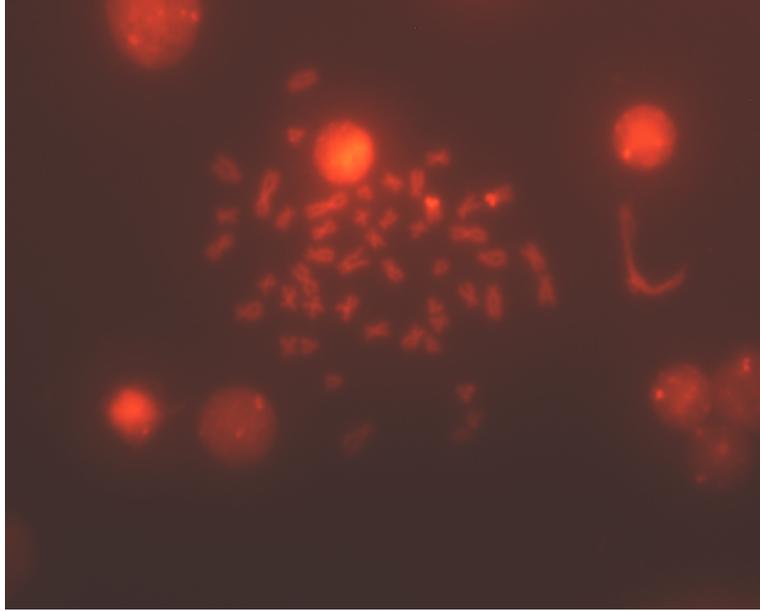
5.1 Técnica De Nitrato De Prata (AgNOR) - HOWELL e BLACK (1980)

De posse da lâmina já contendo o material para análise, hidrolisá-la por 3 minutos em HCl 1N a 60°C, em estufa. Lavar em água corrente e secar ao ar. Pingar uma gota de solução aquosa de gelatina em dois pontos distintos da lâmina, sobre estas gotas adicionar uma gota de água deionizada. Adicionar sobre as gotas anteriores, duas gotas de solução de nitrato de prata (AgNO₃), e cobrir a lâmina com lamínula. Incubar em estufa a 60°C por um período de 3-5 minutos, ou até que a solução adquira uma coloração caramelada. Lavar em água corrente e secar ao ar, analisar em microscópio.



5.2.1 Bandeamento C - SUMMER (1972)

Tratar a lâmina já contendo as gotas do material para análise, com HCl em temperatura ambiente em estufa, por 15 minutos. Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar. Incubar em solução salina de 2xSSC, a 60°C em banho-maria por 15 minutos. Lavar em água corrente e secar ao ar. Incubar a lâmina por 30 segundos em solução de hidróxido de bário (BaOH), em banho-maria a 42°C, com o BaOH sendo recém preparado e filtrado. Lavar a lâmina rapidamente em solução de HCl, e depois em água deionizável, deixar secar ao ar. Incubar a lâmina em solução salina de 2xSSC a 60°C, por 1 hora. Lavar em água corrente e secar ao ar. Corar com Giemsa 5% durante 5-10 minutos. Lavar em água corrente



6 Híbridação *in situ* por fluorescência – FISH

6.1 Preparação da sonda:

Marcação da sonda: método de nick translation utilizando o Kit BioNick™ Labeling System (Invitrogen). Mix para uma lâmina: 1 µl de DNA (200ng/µl); 1 µl de dNTP mix; 1 µl de enzima mix; H₂O para completar 9 µl.

1. Misturar bem, centrifugar brevemente e incubar por 30 minutos a 16°C (no termociclador);
2. Parar a reação com a adição de 1 µl de Stop Buffer;
3. Acrescentar 1/10 do volume (1 µl) de acetato de Sódio 3M e o dobro do volume (22 µl) de etanol 100% gelado;
4. Misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e colocar no freezer – 70°C por 1 hora;
5. Centrifugar por 15 minutos a 15.000 rpm a 4°C;
6. Descartar o sobrenadante e adicionar 50 µl de etanol 70% gelado;
7. Centrifugar por 5 minutos a 15.000 rpm a 4°C;
8. Descartar o sobrenadante com cuidado e deixar secar;
9. Ressuspender em 6 µl de água Milli Q.

6.2. Preparação cromossômica:

Usar lâminas recém preparadas, ou descongelar as lâminas em temperatura ambiente uma hora antes do uso. Desidratar as lâminas em álcool 70, 85 e 100% gelados, por 5 minutos cada.

6.3. Desnaturação dos cromossomos:

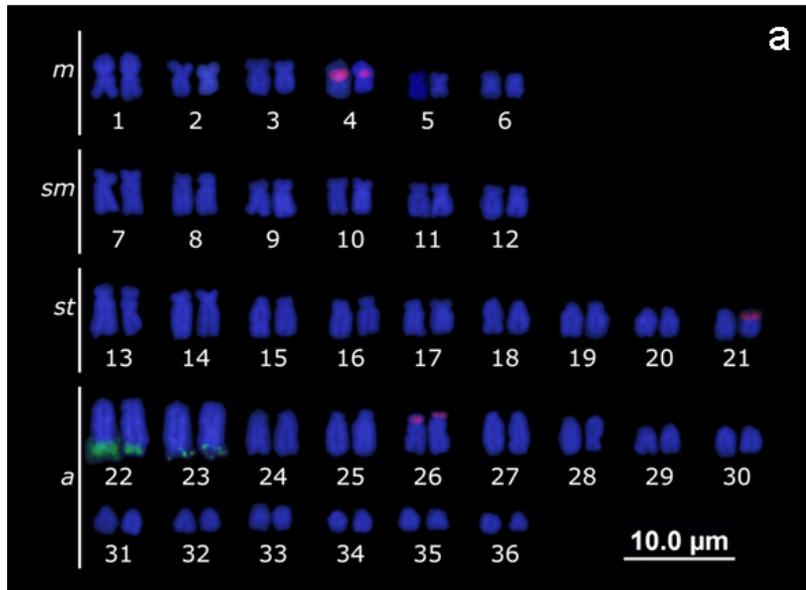
1. Preparar 60 mL de formamida 70% em concentração final de 2xSSC, pH 7,0 a 67°C.
2. Verificar temperatura e pH.
3. Desnaturar as lâminas por 2 min (dependendo da qualidade do material).
4. Desidratar em série alcoólica gelada, 70, 80 e 100%, 2 minutos cada.

Solução de hibridação:

1. Em um tubo Eppendorf contendo 6µl da sonda adicionar 15µl de formamida (concentração final 50%), 6µl de sulfato de dextrano 50% (concentração final 10%) e 3µl de 20xSSC (concentração final de 2xSSC).
2. Desnaturar a sonda a 95°C por 5 minutos e passar imediatamente ao gelo.

6.4. Hibridação

1. Colocar 30µl de solução de hibridação sobre a lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula.
2. Manter as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37°C *overnight*.
3. Remova a lamínula.
4. Lavar em 2xSSC, pH 7,0 a 72°C, em banho sem agitação, por 5 minutos.
5. Transferir para PBD a temperatura ambiente para proceder à detecção.

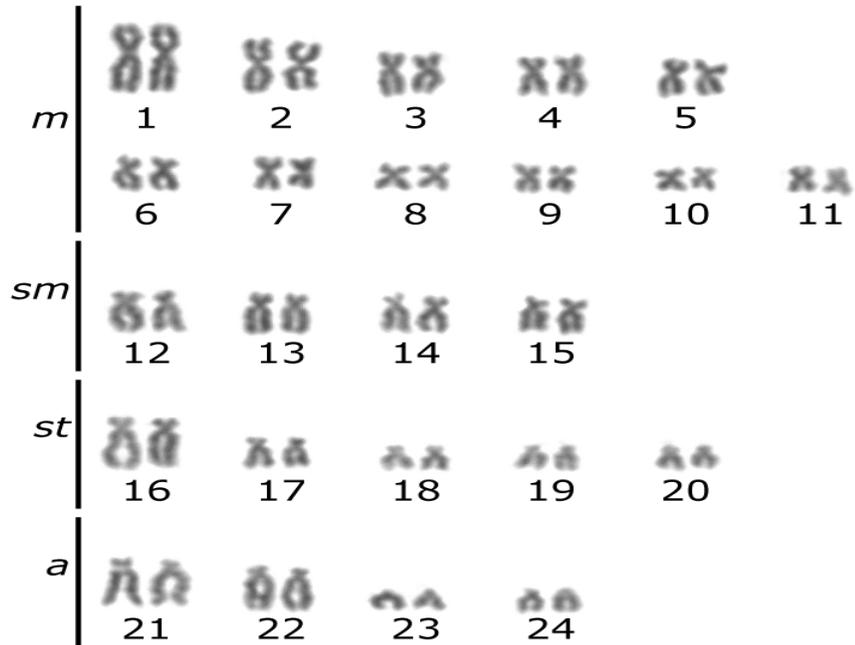


7. Medidas cromossômicas:

Os cromossomos terão sua morfologia estabelecida de acordo com a relação de braços (RB), segundo as proporções propostas por Levan et al. (1964), e serão classificados em: metacêntricos (RB de 1,00 a 1,70), submetacêntricos (RB de 1,71 a 3,00), subtelocêntrico (RB de 3,01 a 7,00) e acrocêntricos (RB maior que 7,00).

7.1 Montagem dos cariótipos:

Feitas as medidas cromossômicas e estabelecido o número de cromossomos metacêntricos (M), submetacêntricos (SM), subtelocêntricos (ST) e acrocêntricos (A), os cromossomos serão arranjados segundo o tipo (M, SM, ST e A) e em ordem decrescente de tamanho.



RESULTADOS ESPERADOS

O presente mini-curso deverá proporcionar ao aluno, um melhor entendimento sobre a citogenética de peixes e a sua aplicabilidade, como instrumento de estudo evolutivo e ferramenta sistemática, detectando diferenças cariotípicas na macro e microestrutura cromossômica da espécie, buscando uma melhor compreensão das suas relações genéticas.

REFERÊNCIAS

ARTONI, R.F.; VICARI, M.R. and BERTOLLO, L.A.C. Cytogenetics of the Neotropical fishes: methods, results and perspectives. Publication/ UEPG: **Biol. Health Scien** 6(1): 43-60, 2000.

BERTOLLO, L.A.C., TAKAHASHI, C.S. and MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Revista Brasileira de Genética**, 2: 103-120, 1978.

HOWELL, W.M. and BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, 36: 1014-1015, 1980.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 4rd ed., John Wiley & Sons, Inc. 600 pp. 2006.

OLIVEIRA C. FORESTI F., A. W. S. HILSDORF. Genetics of neotropical fish: from chromosomes. **Neotropical**, Fish Physiol Biochem (2009) 35:81–100.

SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). **Porto Alegre: Edipucrs**, 375-400, 1998.

SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterocromation. **Exptl. Cell Res. Research**, 75: 304-306, 1972.

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

Prof. Dr. Hélio Conte
Profª. Dra. Ana Silvia Lapenta
Adriana Aparecida Sinópolis Gigliolli
Gislei Maria Rigoni
Géssica de Sousa
Alana Lúcia Oro
Laíse Adriane Hegeto

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 mesentéro 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* (Sthephens), *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 Whole 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 tetrametiletilenodiamina (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 fenitrotion. **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**, v. 99, p. 1206-1212, 2006.

FERNANDES, W.D.; FERRAZ, J.M.G.; FERRACINI, V.L., HABIB, M.E.M. Deterrência 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)**, 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). **Jounal 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**, 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-specific resistance in a strain of the rust red grain beetle *Cryptolestes ferrugineus* (Coleoptera: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
Alessandra Mileni Versuti Ritter
Camila Fernanda Estevão da Silva
Carmem Patrícia Barbosa Lopes
Laura Licia Milani de Arruda

INTRODUÇÃO

A inflamação é definida como um processo fisiopatológico frente a estímulos lesivos com conseqüentes 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 eicosapentanóico (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 fosfolípídeo 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 frequentemente 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 policarbonato 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 policarbonato (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).

A utilização do edema como parâmetro de avaliação em modelos validados, como o modelo de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos, permite avaliar o potencial antiinflamatório tanto por via tópica quanto sistêmica de vários agentes, sejam eles compostos sintéticos, extratos de plantas ou compostos isolados (GÁBOR, 2000; DE YOUNG et al., 1989).

O óleo de cróton, utilizado como agente flogístico apresenta ação tópica e induz uma inflamação local através da ativação da enzima fosfolipase A₂ e conseqüentemente da biossíntese de leucotrienos (LT), prostaglandinas (PGs) e citocinas - mediadores pró-inflamatórios - que promovem vasodilatação, migração de células polimorfonucleares (PMN) e extravasamento de plasma (exsudação plasmática), conduzindo assim, à instalação dos sinais clássicos da inflamação (DE BERNARDIS et al, 1994; FURSTENBERGER et al., 1994). Os modelos de inflamação cutânea permitem identificar compostos com atividade anti-inflamatória que possam ser potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias que acometem a pele, pois promovem condições que se assemelham com alguns tipos de dermatites observadas em humanos (VANE et al.,2000; BOUCLIER et al.,1990; CARLSON et al, 1985).

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 fluido 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 ressuspendidas 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 policarbonato com poros de 5 µm de diâmetro. Na câmara inferior, será colocado 26 mL 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 mL) 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 policarbonato 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 \pm 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 100 μ g) 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 fásia 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.

IV) EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON (VAN ARMAN, 1974, ligeiramente modificado)

- Deixar os animais em jejum de aproximadamente 15 horas.
- Identificar e pesar os camundongos (30 - 40g).
- Realizar tratamento com a substância teste (via oral).
- Após 1 hora, aplicar 20 μ l de óleo de cróton (200 μ g) diluído em acetona na face interna da orelha esquerda do camundongo. A orelha direita receberá apenas o veículo (acetona) (20 μ l).
- Após um intervalo de 6 horas, os animais serão eutanasiados, as orelhas seccionadas em discos circulares de 6,0 mm de diâmetro e pesadas em balança analítica.
- A porcentagem de inibição do edema será determinada pela fórmula:

$$(\%) \text{ de inibição} = \frac{\text{peso da orelha } E_{\text{controle}} - \text{peso da orelha } E_{\text{tratada}}}{\text{peso da orelha } E_{\text{controle}} - \text{peso da orelha } D_{\text{veículo}}} \times 100$$

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.
- BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, p. 127-154, 1990.
- 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.
- CARLSON, R.P.; O'NEILL-DAVIS, L.; CHANG, J.; LEWIS, A. Modulation of mouse ear oedema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v.17 (2), p. 197-206, p. 1985.
- 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., GRESPLAN, 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.
- DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42 (1-2), p.29-33, 1994.
- DE YOUNG, L.M., KHEIFETS, J.B., BALLARON, S.J., YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, p.335-341, 1989.
- 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.
- FURSTENBEGGER, G.; CSUK-GLANZER, B.I.; MARKS, F.; KEPPLER, D. Phorbol ester-induced leukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis. **Carcinogenesis**, v.15(12), p. 2823-2827, 1994.
- GÁBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.
- 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.; HAUSTERMANS 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.
- VAN ARMAN, G. C. Anti-inflammatory Drugs. **Clin. Pharmacol. Ther.** 1974, 16, 900-904.
- VANE, J.R. e BOTTING, R.M. Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **American Journal of Medicine**, v. 104 (3A), p. 2S-8S, 1998.
- 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.

BIOPROSPECÇÃO DE ENZIMAS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO E USO DE USO DE BIOINFORMÁTICA PARA A DESCOBERTA DE NOVOS GENES

Prof^a. Dr^a. Ione Parra Barbosa Tessmann
Doutoranda Carla Bertechini Faria
Mestrando Fausto Fernandes de Castro
Mestranda Munira Churk Lago

INTRODUÇÃO

1 – PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR MICRORGANISMOS

As enzimas são proteínas globulares e, como todas as proteínas, são heteropolímeros de vinte diferentes aminoácidos; algumas incluem em sua estrutura um componente não proteico, covalentemente ligado designado grupo prostético. O que caracteriza cada enzima é o número de aminoácidos componentes de sua cadeia e a ordem em que eles se encontram, ou seja, sua estrutura primária (BORZANI et al., 2001), além da estrutura tridimensional final e do possível número de cadeias de cada proteína.

As enzimas estão divididas em seis classes, segundo a reação catalisada:

1) Oxidorredutases: catalisam reações de oxido-redução; 2) Transferases: catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra; 3) Hidrolases: catalisam reações de hidrólise; 4) Liasas: catalisam a formação de dupla ligação ou catalisam a adição de grupos a duplas ligações transformando-as em ligações simples; 5) Isomerases: catalisam reações de mudança intramolecular em que o substrato é transformado em um produto isômero; 6) Ligases: catalisam a ligação covalente de moléculas.

As aplicações de enzimas estão vinculadas ao mercado mundial e podem ser divididas em aplicações industriais, enzimas para uso médico e enzimas para uso analítico e científico. As principais aplicações, principalmente industriais referem-se á biotecnologia, envolvendo microbiologia, bioquímica, genética e engenharia química e bioquímica no processamento de materiais por agentes biológicos. As enzimas são frequentemente utilizadas para melhoria de processos e possibilitam o uso de novas matérias-primas (LIMA, et al. 2001). Dentre as enzimas utilizadas, 75% delas são

hidrolases (SAID e PIETRO, 2004).O uso de enzimas tem crescido sobremaneira nos setores industriais dos mais diversos tipos, desde as de sabão às farmacêuticas. Isso se deve graças a propriedades ímpares das enzimas. Além de diminuir a energia de ativação, necessária para que o arranjo dos átomos seja favorável às quebras e rearranjos, e, portanto, o tempo para as reações ocorrerem, elas atuam geralmente em condições amenas de pH e temperatura o que é extremamente interessante, pois dispensa as condições extremas geralmente empregadas nas indústrias. Igualmente, as enzimas possuem substratos específicos, são biodegradáveis e substituem os catalisadores inorgânicos que podem ser tóxicos e apresentar problemas de contaminação ambiental quando descartados (AFONSO et al., 2003; UNDERKOFER et al., 1958).

Observando os lados positivos das enzimas e seus possíveis usos, pode-se ter uma ideia errônea quanto à facilidade de seu uso em grandes escalas. Suas diversas qualidades são entravadas pelas produções nos organismos-fonte. Independente do organismo que seja produtor da enzima de interesse, suas produções nunca serão exacerbadas naturalmente, elas sempre terão as produções controladas conforme as condições do meio. Por isso é tão comum os trabalhos de identificação de organismos produtores e otimização (NI et al., 2011; PURI et al., 2005; GHORI et al., 2011).

Apesar das dificuldades em se obter grandes produções, muitas enzimas já possuem usos reais e muito lucrativos. Um dos exemplos mais conhecidos é o uso das amilases. Na década de setenta, o preço do açúcar estava elevado nos Estados Unidos. Houve um grande estímulo para se descobrir uma forma eficiente, por meio do uso de enzimas, para se produzir um substituto do açúcar da cana-de-açúcar, tendo como base o milho. Sendo os grãos do milho ricos em amido, foi desenvolvida uma técnica para a produção de um xarope doce de milho rico em frutose. Utilizaram-se três enzimas: amilase, amiloglicosidase e a glicose isomerase. A amilase foi utilizada para a realização da hidrólise do amido, de forma similar a amiloglicosidase. A degradação completa do amido gera glicose. A frutose, por ser duas vezes mais doce que a glicose, foi escolhida como o açúcar final majoritário. A frutose foi produzida a partir da isomerização da glicose pela glicose isomerase. Dessa forma foi possível criar um xarope doce e um substituto do açúcar de cana.

Um exemplo de empresa produtora da amilase industrial é a Novo Nordisk. Esta empresa utiliza a bactéria modificada *Bacillus licheniformis*. Ela foi modificada para possuir cópias extras de seu gene natural para a enzima amilase. As bactérias são

cultivadas em tanques imensos e cada 500 mililitros da enzima purificada são capazes de converter uma tonelada de amido em açúcares. O transporte da enzima é feito em grandes tanques de caminhões. Este é um exemplo bem sucedido do uso industrial de uma enzima (KREUZER & MASSEY, 2002). Contudo, mesmo um organismo com boa produção teve que ser modificado para atingir valores adequados para o uso industrial.

Os organismos comumente utilizados hoje para a produção e perscrutação de enzimas são bactérias e fungos, pois são facilmente cultivados e suas enzimas geralmente podem ser purificadas mais facilmente. Ademais, as enzimas microbianas são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, o que torna sua produção e uso mais convenientes (AEHLE, 2004; SAID e PIETRO, 2004; BON et al., 2008).

O processo de produção de enzimas a partir de microrganismos, é a mistura de um microrganismo selecionado a um específico substrato por um determinado tempo, a uma determinada temperatura e pH, para que o microrganismo em determinadas condições degrade o substrato e se reproduza à custa daquele, pelo uso das fontes de carbono e nitrogênio, chegando-se a um produto final ou a uma cultura iniciadora. A conversão microbiana pode ser uni ou multi-estágio. Pode ser obtido um ou diversos produtos finais, sendo o processo de separação adotado como o ponto-chave.

Os aspectos que devem ser observados, ao se projetar uma produção de de enzimas por microrganismos, dizem respeito ao microrganismo em si, aos substratos nutricionalmente importantes para o desenvolvimento desses microrganismos e aos processos que serão utilizados na produção e recuperação. Isso também leva em conta parâmetros e variáveis do processo, para otimização e ampliação da escala de produção. Envolve ainda as análises, ou seja, a metodologia de acompanhamento das fases de crescimento, de produção de metabólitos, primários ou secundários, do processo como um todo, incluindo a separação e a formulação (LIMA, 2001).

O início do processo de produção, se dá pela seleção do microrganismo produtor, o qual pode ser obtido por meio do isolamento ou da aquisição junto a Coleções de Cultura. Os microrganismos depositados nessas instituições são listados em manuais, que contem informações sobre a origem, condições de manutenção-estoque e de cultivo, nutrientes específicos ou limitantes, pH, temperatura, etc. (LIMA et al., 2001).

A perscrutação de novos microrganismos produtores se dá, na maior parte das vezes, por meio de processos de isolamento e identificação microbiana. Muitos pesquisadores optam por esses estudos de isolamento junto aos substratos (ar, solo, águas, resíduos) que lhes são afetos, descobrindo-se assim, novas e até mesmo,

melhores e mais adaptadas linhagens (LIMA et al., 2001). Após isolamento, estas são então repassadas para tubos de ensaio de cultura-estoque, cultura esta que pode estar em meio sólido (tubo inclinado com ágar nutritivo), meio líquido, em pó junto a suportes inertes ou na forma liofilizada. Nessas últimas formas, inicialmente o microrganismo deve ser reidratado, para então se iniciar o processo e cultivo. A cultura estoque é aquela cujas características microbianas são conservadas ao longo do tempo. Da cultura-estoque, em meio sólido, o microrganismo é transferido por via asséptica, na maior parte das vezes, usando-se uma alça de platina flambada e resfriada, ao meio sólido ou líquido, cuja composição é adequada às exigências nutricionais do microrganismo (LIMA et al., 2001).

A identificação dos organismos selecionados pode ser feita morfo ou molecularmente. No primeiro caso, são observadas características da morfologia macro e microscópica do microrganismo, como, textura, coloração e crescimento, forma e tamanho dos órgãos produtores de esporos e dos esporos; no segundo, é necessária uma extração do material genético para a identificação molecular, sendo um método mais seguro e confiável de identificação de microrganismos.

Nem sempre é possível achar produtores excepcionais com propriedades excepcionais. Contudo, um produtor pode não apresentar uma excelente produção, mas pode produzir uma enzima com características bioquímicas melhores como maior termoestabilidade e melhor perfil cinético como menor K_m e maior eficiência catalítica o que o torna um produtor interessante (HAKI & RAKSHIT, 2003). Destarte, nem sempre é interessante procurar somente intensas produções, mas também averiguar as propriedades das enzimas produzidas. Isto é comumente averiguado em diversos trabalhos que perscrutam, isolam e caracterizam enzimas promissoras (SOARES et al., 1999; SE-EUN et al., 2007).

A grande diversidade de organismos presentes na natureza faz com que as fontes de estudo em busca da seleção e melhoramento de produtores de enzimas seja inesgotável. A exploração da biodiversidade biológica na busca de organismos hábeis a produzir enzimas consiste em uma boa perspectiva para as áreas científica e comercial.

Enzimas de interesse industrial e suas aplicações

A amilase é a enzima capaz de degradar moléculas complexas de amido em unidades menores chamadas de glicose. As amilases estão entre as enzimas industriais mais importantes, pois apresentam grande importância biotecnológica, tais como aplicações na fabricação de tecidos, cerveja, bebidas destiladas, pão, cereais para alimentação infantil, ração animal e nas indústrias têxteis, de panificação, liquefação e sacarificação do amido, química e farmacêutica. Apesar de poderem ser derivadas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, as amilases microbianas geralmente encontram grande demanda industrial e, atualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente (GUPTA et al., 2003; MORAES, 2004; PANDEY et al., 2000; PANDEY et al., 2005). Bactérias como *Bacillus* spp. e fungos filamentosos como *Aspergillus* spp. são consideradas as mais importantes fontes de amilases (PANDEY et al., 2000).

As celulasas são enzimas capazes de degradar a celulose, que é um importante componente da parede celular de plantas. O complexo enzimático denominado de celulasas é constituído de um conjunto de hidrolases glicosídicas, secretadas por microrganismos e plantas. As celulasas são enzimas de importância econômica que são vendidas em grande volume tendo diferentes aplicações industriais, como por exemplo, na indústria de alimentos, no processamento do amido, produção de ração animal, fermentação de grãos para produção de álcool, extração de suco de frutas e de polpa de vegetais, indústria de papel, indústria têxtil, assim como na agricultura e em pesquisas (BHAT, 2000). Microrganismos que excretam celulasas desempenham um importante papel na natureza por sua capacidade de decompor resíduos lignocelulósicos estabelecendo um elo chave no ciclo do carbono. Enzimas celulolíticas ocorrem em diversas classes de fungos, que além de as utilizarem para a decomposição de partes duras da planta, as utilizam para associações micorrízicas e patogênicas com plantas (GOYAL et al., 1991). As celulasas de bactérias e fungos são encontradas na forma individualizada, mas também podem formar um complexo enzimático multipolimérico denominado de celulosoma, tal como o produzido por *Clostridium thermocellum*. Entre os complexos celulolíticos de bactérias e fungos estudados, o mais conhecido é o do fungo filamentoso *Trichoderma resei* (DILLON, 2004). Celulasas também são produzidas por fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* e *Fusarium* (DILLON, 2004; PHALIP et al., 2009).

Proteases são enzimas degradativas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas de proteínas produzindo peptídeos e aminoácidos (RAO et al., 1998). A abrangência catalítica das proteases possibilita que elas sejam utilizadas nas indústrias produtoras de alimentos, de detergentes e de rações, nas indústrias químicas e farmacêuticas, nas indústrias de processamento de couro e do processamento de lixos (GODFREY & WEST, 1996). As enzimas atualmente comercializadas para uso industrial são produzidas por microrganismos (fungos e bactérias), plantas e animais. Poucas espécies de microrganismos são produtores de proteases utilizadas industrialmente e a grande maioria (90%) das proteases utilizadas não é de origem microbiana (GODFREY & WEST, 1996). As proteases de origem microbiana, entretanto, são preferidas em relação às de origem animal e vegetal por expressarem características desejadas para a aplicação biotecnológica (GODFREY & WEST, 1996). As proteases de origem microbiana são de bactérias do gênero *Bacillus* e de fungos do gênero *Aspergillus* (FELIX et al., 2004).

As lipases compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam geralmente na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ésteres formados por ácidos graxos de cadeia longa. Embora a função biológica destas enzimas seja, primordialmente, catalisar a hidrólise de triglicerídeos insolúveis para gerar ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol, a maioria das lipases pode exercer sua atividade catalítica reversa, em condições em que a disponibilidade de água no meio é reduzida, catalisando também reações de esterificação e transesterificação, entre outras (SHARMA et al., 2001). As lipases constituem um grupo de catalisadores com várias aplicações biotecnológicas devido as suas características, tais como: amplo reconhecimento de substratos, alta estereoseletividade, estabilidade em solventes orgânicos e a falta da necessidade de cofatores (JAEGER e REETZ, 1998; JAEGER e EGGERT, 2002). As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de enzimas valiosas de aplicação biotecnológica, principalmente pela versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade ao substrato, e pela facilidade de produção em massa, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial. Particularmente, as enzimas microbianas são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e segura (HASAN et al., 2006). O campo comercial mais importante para aplicação das lipases encontra-se na indústria de detergentes e limpeza (JAEGER e REETZ, 1998). As lipases também são utilizadas no tratamento de efluentes e na indústria de papel e celulose para remoção de

triacilgliceróis e ceras. Na indústria de alimentos pode ser utilizada para lipólise de manteiga e cremes, como aditivo na produção de queijos, na panificação e na esterificação de gorduras e óleos (PANDEY *et al.*, 1999; GUPTA *et al.*, 2004). A estereoseletividade das lipases é útil na síntese de biopolímeros como polifenóis e poliésteres, na resolução cinética de misturas racêmicas de álcoois secundários em reações de hidrólise e na esterificação e transesterificação (JAEGER e EGGERT, 2002). Fungos filamentosos são amplamente reconhecidos como sendo as melhores fontes de lipases, com várias patentes de aplicação da enzima tendo sido desenvolvidas (CÁRDENAS *et al.*, 2001). Um grande número de lipases de fungos filamentosos tem sido estudado extensivamente sob os pontos de vista genéticos e bioquímicos. As espécies melhores produtoras descobertas pertencem aos gêneros *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Rhizomucor* (STCKLEIN *et al.*, 1993).

Produção industrial de enzimas

Em relação à produção industrial de enzimas microbianas, FELLOWS (1994) recomenda que sejam observados os seguintes requisitos: os microrganismos devem ser capazes de crescer em substratos de baixo custo; a produção de enzima deve ocorrer em um ritmo elevado, constante e em curto espaço de tempo; os métodos para a recuperação das enzimas devem ser simples e de baixo custo; e a preparação enzimática obtida deve apresentar estabilidade.

As enzimas microbianas são obtidas tanto por cultivo superficial em substratos sólidos, como por exemplo: farelo de trigo, milho, cascas de algumas frutas, preparados à base de soja, farinha de trigo, cacau em pó, grãos de cereais, legumes, madeira e palha (FELLOWS, 1994; WARD, 1989) como também podem ser obtidas por cultivos submersos com o emprego de substratos líquidos. O substrato deve conter uma fonte de carbono (fonte energética) e uma fonte de nitrogênio que permitam a proliferação celular. Além disso, podem requerer também nutrientes específicos para o crescimento e determinados minerais para a produção de enzima. Geralmente os substratos escolhidos não são dispendiosos e são encontrados em abundância como os melaços, hidrolisados de amido e água de maceração de milho (FELLOWS, 1994).

Os processos fermentativos envolvem uma série de variáveis. De acordo com SAUCEDO-CASTANEDA *et al.* (1992), mesmo em laboratório, o sistema de fermentação em estado sólido é afetado por diversos fatores, que incluem: (a) pré-

tratamento do sólido; (b) composição do meio; (c) pH inicial do meio; (d) condições de autoclavagem; (e) forma, idade e quantidade de inóculo; (f) agitação; (g) aeração; (h) temperatura; (i) umidade do meio; e (j) umidade no fermentador.

A produção de enzimas pelo cultivo submerso exige a preparação prévia de um inóculo que é preparado nas mesmas condições de incubação que o cultivo final para a produção da enzima. A produção de enzimas em escala industrial se faz majoritariamente por fermentação submersa, mas quando feita em estado sólido, são utilizados fermentadores do tipo tambor ou bandeja (LIMA et al., 2001). Após a fermentação, as enzimas extracelulares são recuperadas do meio por centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação de outros métodos. As enzimas intracelulares são extraídas mediante rompimento celular, sendo que neste caso a recuperação da enzima é mais difícil e seu rendimento é inferior, porque parte da enzima pode permanecer retida na massa celular. Quando é necessária a extração do restante da enzima intracelular, pode-se proceder à precipitação com acetona, álcoois, sulfato de amônio ou por ultrafiltração (FELLOWS, 1994).

2 – A REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)

A reação da polimerase em cadeia consiste de um processo simples, rápido, e altamente sensível que envolve a síntese enzimática *in vitro* de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Dois oligonucleotídeos sintéticos são preparados, complementares às sequências do DNA-alvo em fitas opostas, em posições que definem a extremidade do segmento a ser amplificado. Os oligonucleotídeos servem como iniciadores de replicação que podem ser estendidos pela DNA-polimerase. As extremidades 3' das sonda hibridadas são orientadas umas em direção à outra e posicionadas para iniciar a síntese de DNA sobre o segmento desejado do DNA. O resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência de DNA em bilhões de cópias.

As bases teóricas da PCR envolvem etapas de aquecimento e resfriamento que são repetidas durante o processo de amplificação do DNA molde. Desta forma, cada ciclo de PCR é constituído de três etapas, que são denominadas: desnaturação, anelamento e extensão. No processo de desnaturação, as fitas do DNA alvo são desnaturadas e separadas através do aquecimento. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida, permitindo a hibridização entre uma das fitas de

DNA molde e os oligonucleotídeos iniciadores de sequências complementares que flanqueiam a região alvo a ser amplificada. Dessa forma, uma nova cópia da sequência-alvo pode ser sintetizada na etapa de extensão, por meio da adição de nucleotídeos a partir de cada terminal 3' dos iniciadores pela DNA-polimerase. Os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão podem ser repetidos de 20 a 40 vezes, e, ao final de cada ciclo, ocorre a duplicação do número de moléculas de DNA, isto é, há uma amplificação exponencial da sequência do DNA-alvo. A amplificação exponencial é dada por 2^n ; onde n corresponde ao número de ciclos na reação, por exemplo: ao término de 20 ciclos haverá 220 cópias de uma região específica de determinada sequência genômica, ou seja, mais de um milhão cópias da porção amplificada do DNA-molde. Esta propriedade da amplificação permite que a reação seja iniciada com quantidades mínimas de DNA (da ordem de picogramas ou nanogramas) e, em seu término, permite que existam grandes quantidades de DNA de uma sequência de interesse.

Componentes essenciais para a PCR

A reação de PCR necessita de basicamente seis componentes essenciais descritos a seguir.

- DNA molde:

A reação sempre parte de um DNA molde, extraído convenientemente da amostra, ou de uma amostra de RNA, convertida à cDNA. Para sucesso da PCR a sequência gênica a ser amplificada deve ser intacta e, além disso, os ácidos nucléicos devem estar livres de impurezas (proteínas, lipídeos, e reagentes de extração, etc). A concentração e a qualidade de DNA influenciam os lucros da reação. De modo geral, no caso de DNA genômico de mamífero, até 1 ug de DNA é utilizado por reação, uma quantidade que contém aproximadamente 3×10^5 moléculas de DNA molde. Os valores típicos para DNAs de leveduras, bactérias, e DNAs plasmidiais utilizados por reação são 10 ng, 1 ng e 1 pg, respectivamente. Uma regra geral que pode ser estabelecida é que 1 ug de uma amostra de DNA de dupla fita com 1Kb contém $9,12 \times 10^{11}$ moléculas de DNA (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

- DNA polimerase:

Em PCRs de rotina, a Taq DNA polimerase continua sendo a enzima de escolha. São requeridas de 0,5 – 2,5 unidades da enzima para cada 25 – 50 μ L da reação padrão. Normalmente, a maioria das DNA polimerases disponíveis no mercado são fornecidas

conjuntamente com uma solução-tampão específica, cuja composição varia de acordo com o fabricante. Basicamente, essas soluções contêm íons diversos (Na^+ , Cl^- , K^+ , entre outros) que aperfeiçoam as condições de reação.

- Um par de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos:

Os iniciadores são sequências curtas de oligonucleotídeos (12 a 35 bases) complementares a uma região específica no DNA alvo. Ao se iniciar um estudo, o desenho do iniciador pode ser obtido na literatura ou realizado pelo pesquisador por meio de programas de bioinformática específicos disponíveis no mercado. Em reações padrão, as quantidades típicas de iniciadores variam de 0,1-0,5 mM de cada iniciador (6×10^{12} a 3×10^{13} moléculas). Esta quantidade é suficiente para pelo menos 30 ciclos de amplificação de um segmento de 1kb do DNA (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

- Desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs):

Uma reação padrão de PCR deve conter quantidades equimolares de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Os desoxinucleotídeos são a matéria-prima propriamente dita para a síntese das fitas-filhas. Estes são ligados à fita-mãe pela polimerase em uma área delimitada pelos iniciadores.

- Cátions divalentes:

Todas as DNAs polimerases termoestáveis requerem cátions divalentes livres, geralmente o Mg^{2+} , para sua atividade.

- Solução tampão:

O tampão mais frequentemente utilizado em PCR é o Tris 10 mM, com pH variando entre 8,5 e 9,0 a 25°C. Com o aumento da temperatura pelo termociclador o pH diminui para 7,4, que é um valor ótimo para atividade da Taq DNA polimerase na temperatura de 72°C (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

Regras básicas para o desenho de iniciadores

Na maioria das aplicações da PCR, é a sequência do iniciador que determina o sucesso geral do ensaio. Nesse contexto, algumas propriedades dos oligonucleotídeos que influenciam na eficiência da amplificação devem ser consideradas, com a finalidade de garantir que a estabilidade e a especificidade na ligação sejam adequadas, dentre elas destacamos:

- Quantidade de C e G deve estar entre 40% e 60%, e ter uma distribuição uniforme ao longo de todo o iniciador. Esta condição garante uma maior estabilidade de hibridização,

- A região do iniciador complementar ao molde deve ter comprimento variando entre 18 e 28 pb. O ideal é que o par de iniciadores não apresente uma variação de mais de três pares de bases entre eles,
- Regiões contendo sequências palindrômicas devem ser evitadas,
- Ausência de complementariedade entre as extremidades 3' para que seja evitada a formação de dímeros de iniciadores,
- A temperatura de anelamento (T_m) dos iniciadores direto e reverso deve ser mantida próxima e não muito baixa, para que a ligação inespecífica seja evitada. Temperaturas de anelamento entre 55°C e 80°C são desejáveis,
- A extremidade 3' dos iniciadores deve conter grampos de CG,
- Deve existir um único sítio de pareamento no DNA molde onde ocorre a ligação do iniciador, o que significa que a sequência do iniciador é única dentro da sequência do DNA.

3 - BIOINFORMÁTICA

A bioinformática é simplesmente o uso da informática para a geração e gerenciamento de bioinformação. A internet possibilitou um compartilhamento de informação incrível. As pessoas estão mais acostumadas ao compartilhamento de fotos, músicas, mas no meio da pesquisa há, desde algum tempo, um crescente armazenamento de dados públicos. A bioinformática pretende: representar, armazenar e distribuir dados, além de desenvolver ferramentas analíticas para desvendar o conhecimento contido nos dados. Desse modo, cientistas de todo o mundo que estudam assuntos semelhantes podem se beneficiar de dados já obtidos, evitando etapas desnecessárias. Por exemplo, um pesquisador que estuda a hexoquinase de cães pode estar interessado em comparar a(s) sequência(s) gênicas obtidas com outras espécies para relacionar a filogenia entre elas. Em um passado não muito distante, seria necessário obter também as sequências das outras espécies de interesse. Hoje, com diversas sequências obtidas e armazenadas os trabalhos se tornam mais dinâmicos e práticos – economia de tempo e recursos.

Banco de dados

Ao conjunto de dados armazenados e disponíveis se dá o nome de banco de dados. Os dados são relacionados entre e si, sempre são inseridos com o respaldo de um artigo publicado, e são organizados de tal modo que o usuário recupere informações, tire conclusões e tome decisões, portanto, os dados devem ser dispostos de maneira lógica e auferível.

Banco de dados não englobam todos os dados possíveis de todas as áreas possíveis, mas focam em alguns tipos de dados para que se atinja o objetivo anterior mencionado. A maioria dos bancos de dados é direcionada para a biologia molecular que possui uma infinidade de informações que vão desde um sequenciamento completo de um organismo às proteínas resolvidas dos genes codificadores. Para exemplificarmos o que podemos obter a partir de um banco de dados de uma forma visual, pensemos em um gene. Pensemos no mesmo gene da hexoquinase de cães que citamos anteriormente. A Figura 1 resume as informações auferíveis quando temos em mente um gene, que no nosso exemplo codifica a enzima hexoquinase em cães.

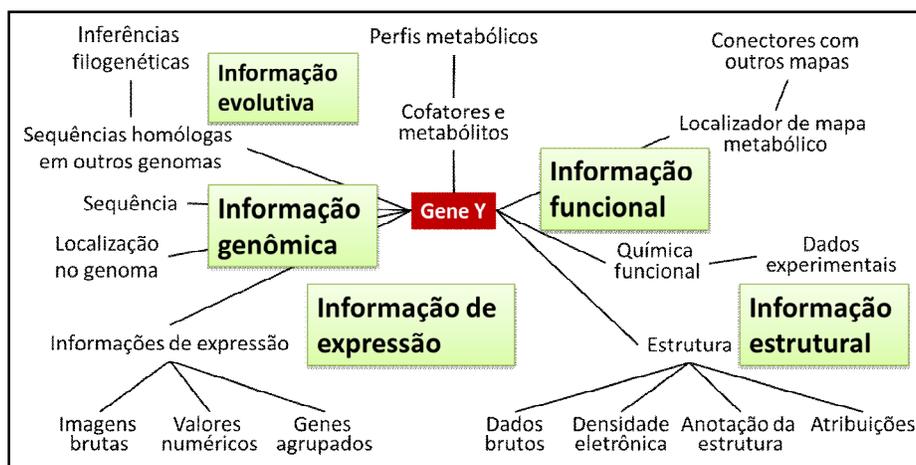


Figura 1. Informações encontradas em banco de dados quando se tem um gene em mente, que em nosso exemplo codifica a hexoquinase de cães, denominado Gene Y.

Assim, a partir das tecnologias atuais, é possível a partir de uma sequência ou um fragmento de sequência, encontrar nos bancos de dados sequências que sejam similares e a partir de uma estrutura proteica, ou parte de, encontrar estruturas similares no banco de dados. Por meio destas ferramentas, associadas a uma infinidade de dados bibliográficos armazenados, podemos alcançar objetivos exemplificados na Figura 1.

Além dessa infinidade de informações, inerentes a organização celular, possuímos outra infinidade de organismos. Portanto, não é de se estranhar que o

aumento no número de informações é impressionante, como representado nos gráficos das Figuras 2.

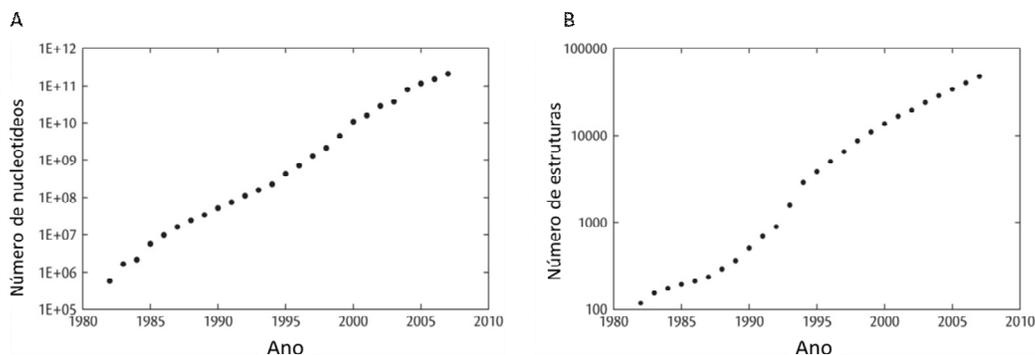


Figura 2. A) Crescimento do GenBank, um banco de dados de arquivos de seqüências genéticas do US National Center for Biotechnology Information (NCBI). B) Crescimento do Protein Data Bank (PDB), um arquivo de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas. Figuras obtidas de LESK, 2008.

Esse aumento exorbitante dos dados exige um aprimoramento contínuo para que essas informações estejam sempre acessíveis e organizadas. Ademais, a necessidade de programas adequados para as diversas análises possíveis tornam a área da bioinformática extremamente promissora.

Há dois tipos principais de banco de dados. Os primários, cuja deposição é direta e sem processamento, e os secundários, que derivam dos primários e apresentam alguns tipos de análises. Alguns links de banco de dados primários de seqüências de DNA são: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (NCBI); <http://www.ebi.ac.uk/> (EMBL); e <http://www.ddbj.nig.ac.jp/> (DDBJ).

O arquivo de seqüências de nucleotídeos é mantido por uma parceria entre as três entidades acima relacionadas. Já o arquivo de seqüências de aminoácidos de proteínas é mantido pelo United Protein Database (Uniprot), que é um exemplo de banco de dados secundário. O Uniprot é uma junção dos bancos de dados do SWISS-PROT, do The Protein Identification Resource (PIR) e do Translate EMBL (TrEMBL) (<http://www.uniprot.org/>)

Há vários outros tipos de banco de dados na Biologia Molecular, como banco de dados de genoma, banco de dados de genomas focalizados em espécies individuais (Ensembl), bancos de dados de padrões de expressão proteica (ETS), bancos de dados de rotas metabólicas (KEGG) e bancos de dados bibliográficos (pubmed).

Análise de sequências

A análise de sequências obtidas geralmente é focada na procura por sequências similares em banco de dados. Imagine que você descobriu um gene em uma bactéria que codifica uma enzima com atividade de amilase. Provavelmente você gostaria de averiguar se existe em outras espécies um gene similar ao seu. Para tanto, o método escolhido por você deve ser tanto sensível, para que possa identificar até mesmo sequências pouco relacionadas, quanto seletivo, para que as sequências encontradas possuam relações verdadeiras. Há diferentes tipos de BLAST, que diferem quanto ao tipo de sequência analisada:

- BLASTN – Pesquisa bancos de dados de nucleotídeos usando uma sequência de nucleotídeos em questão. Algoritmos: blastn, megablast, discontinuous megablast.
- BLASTP – Pesquisa bancos de dados de proteínas usando uma sequência de proteína em questão. Algorithms: blastp, psi-blast, phi-blast.
- BLASTX – Pesquisa banco de dados de proteínas usando uma sequência de nucleotídeo traduzida em questão.
- TBLASTN – Pesquisa um banco de dados de nucleotídeos usando uma proteína em questão.
- TBLASTX – Pesquisa bancos de dados de nucleotídeos traduzidos usando um nucleotídeo traduzido em questão.

Alinhamento de sequências

O alinhamento é a tarefa de localizar regiões equivalentes de duas ou várias sequências, tanto de nucleotídeos como de proteínas, para maximizar suas similaridades. É ele que permite a busca de similaridades em banco de dados, além de permitir a realização de medidas de conservação, análise filogenética, estabelecimento de motivos conservados e determinação de famílias de proteínas (Figura 3).

```
ACCATCGGTGGTTCGTGGAGCGGTGCCCGTGGCGGTAAGAACGGT
GAAATCTA
ACCATCGGTGGCTCATGGAGCGGTCCCCGTGGCGGCAAGAACGGT
GAAATCTA
***** ** ***** ***** *****
```

Figura 3. Exemplo de alinhamento entre duas sequências de DNA. Os asteriscos indicam nucleotídeos conservados.

O alinhamento é a atribuição de correspondências entre pares de resíduos e as diferenças existentes entre duas sequências são devidas às mutações, seleção natural, inserções ou deleções, fusão de sequências a partir de dois diferentes genes e duplicação gênica.

Por meio do alinhamento das sequências podemos determinar a identidade e a similaridade das mesmas. A *identidade* descreve o grau ao qual uma ou mais sequências são idênticas em cada posição de um alinhamento e é medida contando o número de bases idênticas pareadas no alinhamento; *similaridade* refere-se a um termo descritivo que indica que duas sequências mostram algum grau de correspondência, sendo usada também para sequências de proteínas como sendo o número de aminoácidos idênticos mais aqueles similares.

O alinhamento precisa ser quantificado para se determinar a similaridade entre duas sequências. Matrizes de substituição aparecem em todas as análises envolvendo comparação de sequências de proteínas. Elas fornecem uma pontuação numérica baseada na probabilidade de mudanças relevantes ocorridas durante a evolução. As principais matrizes de substituição são: PAM e BLOSSUM. Matrizes PAM são baseadas em modelos evolutivos explícitos, de um alinhamento global e indicam distância evolutiva; matrizes BLOSSUM são baseadas em modelos evolutivos implícitos e indicam porcentagem de identidade.

O programa utilizado para o alinhamento é o ClustalW. As páginas públicas mais citadas para uso do ClustalW são: a do EBI e a do genome.jp com seus respectivos endereços eletrônicos: <http://www.ebi.ac.uk/Tolls/msa/clustalw2/> e <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>

Muitos programas utilizam o formato FASTA para o alinhamento de sequências. O formato FASTA é definido pelo símbolo >, para a leitura de sequências ou para a informação de seus resultados. Um exemplo de sequência em formato FASTA é dado na Figura 4.

```
>Glutathione peroxidase bovina
MCAAQRSAAALAAAAPRTVYAFSARPLAGGEPFNLSSLRGKVLLIENVASLUG
TTVRDYYQMNDLQRRLGPRGLVVLGFPCNQFGHQENAKNEEILNCLKYVRPG
GGFEPNFMLEKCEVNGEKAHPLFAFLREVLPTPSDDATAALMTDPKFITWSPVC
RNDVWNFEKFLVGPDPGVPVRRYSRRFLTIDIEPDIETLLSQGASA
```

Figura 4. Exemplo do formato FASTA da sequência da proteína Glutathione Peroxidase bovina. Na primeira linha há informações sobre a proteína.

Análise Filogenéticas

Atualmente, as análises filogenéticas modernas são baseadas em biologia molecular (sequências de DNA e de proteínas) e não mais na morfologia - e são muito úteis em investigação de relacionamento evolutivo entre espécies e na investigação de evolução funcional de uma classe de proteínas. Seguindo basicamente a teoria da evolução: eventos de especiação guiam para criação de espécies diferentes e esta pode ser causada por separação física em grupos onde diferentes variantes genéticas tornam-se dominantes; e qualquer duas espécies dividem um (possivelmente distante) ancestral comum.

Em nível molecular, a comparação é feita entre as sequências de nucleotídeos de genes homólogos ou sequências de aminoácidos de proteínas homólogas em espécies diferentes. As regiões ITS (Internal transcribed spacers) são muito utilizadas para comparações entre espécies, grupos e subgrupos. Algumas regiões são úteis para comparações em nível do gênero ou da espécie, outras são apenas úteis em nível da família.

Para se demonstrar estas relações filogenéticas, faz-se uso de árvores filogenéticas que resumem os principais aspectos de uma história evolutiva inferida. Ela é um diagrama que propõe uma hipótese para reconstrução do relacionamento evolutivo entre um grupo de objetos.

Para a reconstrução filogenética, utilizam-se métodos, dentre eles, os baseados em distância evolutiva e os baseados em caracteres. Na primeira, as sequências alinhadas são convertidas em uma matriz de distância – a matriz é usada para inferir a ordem e os comprimentos dos ramos nas árvores - e na segunda se usa o alinhamento diretamente. Para estimar a confiabilidade da árvore gerada, há o método bootstrap, uma estatística de topologia. Quanto maior o valor do bootstrap obtido após o cálculo, maior a proximidade entre as espécies.

Desenho de iniciadores de PCR

O processo de desenho dos iniciadores é uma etapa chave para um PCR bem sucedido, necessitando do conhecimento prévio da sequência de DNA alvo, onde se deseja que esses iniciadores sejam ligados. O desenho dos iniciadores é dividido em várias fases: busca e escolha das sequências de interesse; alinhamento das sequências e determinação do consenso; seleção da região consenso mais conservada, além da escolha e teste dos iniciadores. Vários programas de bioinformática estão disponíveis

para o desenho de pares de iniciadores para a PCR a partir de um molde de DNA, sendo o mais comumente usado o Primer 3 (<http://simgene.com/Primer3>).

4 - O PRESENTE MINICURSO

O presente minicurso visará, em uma de suas etapas, ensinar como é feita a bioprospecção de fungos produtores das enzimas amilases e lipases. Em segundo lugar, o presente minicurso pretende ministrar uma pequena introdução às ferramentas principais da bioinformática, focando sua aplicabilidade na identificação de genes de amilases e lipases em genomas sequenciados de fungos e no desenho de iniciadores degenerados de PCR para posterior clonagem de novos genes em microrganismos produtores.

PARTE PRÁTICA

1 – ATIVIDADES

1. Produção de meios de cultura e obtenção de microrganismos
2. Isolamento monospórico.
3. Preparo de inóculos.
4. Prospecção dos microrganismos isolados quanto à capacidade produtora de amilase e lipase por halo de degradação em meio com substrato específico.
5. Introdução à bioinformática: pesquisa em bancos de dados, alinhamento de sequências e desenho de iniciadores de PCR.

2 - PROTOCOLOS

Meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar)

Composição:

- Batata (extrato) 200g
- Ágar 20g
- Dextrose (glicose) 15g
- H₂O destilada q.s.p. 1L

Modo de preparo:

- 1) Remova a pele das batatas e corte-as em cubos de 1 cm³
- 2) Pese os cubos e lave-os rapidamente em água destilada.
- 3) Ferva os cubos até que se tornem macios (cozidos totalmente)
- 4) Filtre através de uma gaze apertando a polpa tanto quanto for possível
- 5) Adicione a glicose e dissolva bem
- 6) Complete o volume total com água destilada e transfira para um Erlenmeyer
- 7) Adicione o ágar
- 8) Acondicione o Erlenmeyer com bucha e papel
- 9) Esterilize em autoclave por 20 minutos a 121°C.

Obs.: Para fazer tubos inclinados distribuir de 6-10 mL em cada tubo (dependendo do diâmetro do tubo) antes de autoclavar. Colocar buchas, autoclavar e ainda quente inclinar os tubos em um suporte. Para fazer placas, depois de autoclavar, vazar em placas estéreis sob a proteção da chama do bico de Bunsen.

Obtenção dos microrganismos

Os microrganismos que serão obtidos no minicurso provirão do ar e de alimentos comercializados, como trigo para quibe. Para a captação dos organismos do ar, serão abertas algumas placas com o meio BDA por trinta minutos. O trigo para quibe não receberá tratamento e será colocado (0,1 g) em algumas placas contendo meio BDA. Após inóculo, as placas serão incubadas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. As culturas serão observadas em um tempo de 3 a 4 dias.

Isolamento monospórico

O isolamento monospórico será realizado como proposto por NELSON et al. (1983), como descrito a seguir.

- Um fragmento de BDA contendo uma colônia é picotado e agitado em 5-20 mL de água destilada estéril.

- Cem microlitros da suspensão obtida são espalhados na superfície de uma placa de 10 cm de diâmetro contendo ágar água 2,5%.
- A placa é incubada por 18 a 48 horas a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas.
- Com o auxílio de uma lupa, um fragmento do meio contendo apenas um esporo ou um fragmento de hifa germinando é removido e transferido para um tubo com meio BDA inclinado.
- O tubo é incubado por cinco a sete dias, nas mesmas condições, e as características culturais são observadas.

Análise das atividades enzimáticas por halo de degradação

A análise da atividade enzimática por halo de degradação é feita em um meio específico, onde o substrato a ser degradado é a única fonte de carbono. Adotam-se geralmente limiares para se considerar uma atividade boa, média ou ruim. Em nosso minicurso será adotada o índice igual ou maior que dois um bom índice enzimático. O índice enzimático (IE) é a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação (R) e o diâmetro médio da colônia (r) (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975).

$$IE = R/r$$

Atividade amilolítica

O meio comumente usado para a averiguação da produção de amilases é o ágar nutriente (extrato de levedura 3 g/L, peptona 5 g/L, ágar 15 g/L) com 2 g/L de amido solúvel. Após o crescimento dos microrganismos, as placas são reveladas com 5 mL de solução de lugol (iodo 5 g/L; iodeto de potássio 10 g/L) para detecção do substrato remanescente. A atividade amilolítica é avaliada pela zona amarela clara ao redor da colônia de cada isolado, i.e., o halo de degradação do amido.

Atividade lipolítica

A atividade lipolítica será determinada através do seguinte meio de cultura: peptona 10 g/L; NaCl, 5 g/L; CaCl₂·2H₂O 0,1 g/L; ágar 17,0 g/L, e como substrato lipídico o polioxietileno sorbitan-monolaurato (Tween 20) 10 mL/L (SIERRA, 1957). O Tween 20 será autoclavado separadamente, por 15 minutos e adicionado, posteriormente, ao meio basal que também será esterilizado em autoclave. Após cultivo,

as placas serão incubadas a 4°C, por 12 horas, para melhor visualização. A atividade lipolítica é avaliada pela presença de um halo opaco de precipitado branco formado ao redor das colônias. O precipitado branco é resultado da formação de sabões de cálcio insolúveis pela liberação de ácidos graxos do Tween 20 pela lipase e reação com o cálcio do meio.

Bioinformática

Para uma possível futura clonagem de novos genes de amilases e de lipases dos novos fungos produtores, será necessário, por exemplo, o desenho de iniciadores de PCR ou de sondas de hibridização. Para isso, sequências gênicas que codificam estas enzimas em outros fungos são recuperadas de bancos de dados e alinhadas para a evidência de regiões conservadas. A partir destas regiões, é possível o desenho de iniciadores de PCR ou de sondas de hibridização. Com estes iniciadores é possível tentar amplificar o gene a partir do DNA genômico do novo produtor e, em seguida, cloná-lo. Com as sondas de hibridização é possível fazer a análise de uma biblioteca genômica ou de cDNA produzida a partir do novo produtor.

- 1) Localizar sequências de genes que codificam amilases e lipases em diferentes espécies de fungos na página da PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) no item “nucleotide” ou “genomes”. Escolher sequências de mRNAs ou cDNAs (completos).
- 2) Copiar as sequências escolhidas e colar no programa Word.
- 3) Transformar as sequências para o formato FASTA.
- 4) Abrir um programa CLUSTALW online, colar as sequências gênicas obtidas e realizar a análise de alinhamento.
- 5) Procurar regiões conservadas.
- 6) Desenhar iniciadores manualmente ou como programa Primer 3.

REFERÊNCIAS

AFONSO, J. C.; AGUIAR, R. M.; SILVA, G. C. O problema do descarte de catalisadores industriais de hidrotratamento. **Bol. téc. Petrobras**, Rio de Janeiro, v. 46 (3/4), p. 325 – 333, jul./dez., 2003.

AEHLE, W. **Enzymes in industry**. Production and Applications. Second edition. Germany: Wiley-VCH Verlag, 2004.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**. v. 18, p. 355-383, 2000.

BON, E. P. S.; PEREIRA Jr., N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; SÁ-PEREIRA, P.; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S. *et alli*. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 95-122.

BORZANI, W., et al. Elementos de enzimologia. In: TORRES, B. B. **Biotecnologia Industrial**; Volume I: Fundamentos. 1. ed., São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001.

CÁRDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ M.S.de; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; VALMASEDA, M.; ÉLSON, S.W. SINISTERRA, J.V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic**, v. 14, p. 111–123, 2001.

DILLON, A.J.P. Celulases. In SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa, Ltda, 2004.

FELIX, C. R.; NORONHA, E. F.; MARCO, J. L. Proteases: características e aplicações industriais. In SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Ed. Legis Summa, Ltda, 2004.

FELLOWS, P. **Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Prácticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 172-177, 1994.

GHORI, M. I.; IQBAL, M. J.; HAMEED, A. Characterization of a novel lipase from *Bacillus sp.* isolated from tannery wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 22-29, 2011.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzimology**. Second edition. New York: Macmillan Publisshers, inc., 1996.

GOYAL, A.; GHOSH, B. E EVELEIGH, D. Characteristics of Fungal Cellulases. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 37-50, 1991.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 1-18, 2003.

- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.
- HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia** v. 67, p. 597-607, 1975.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- KREUZER, H., MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia**. Segunda edição. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- LESK, A. M. **Introdução à Bioinformática**. Segunda edição. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- LIMA et al. **Biotecnologia Industrial**; Volume 3: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001.
- MORAES, L.M.P. Amilases. In SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, Ltda, 2004.
- NI, H.; LI, L.; XIAO, A.; CAO, Y.; CHEN, Y.; CAI, H. Identification and characterization of a new naringinase-producing strain, *Williopsis californica* Jmudeb007. **World. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, p. 2857-2862, 2011.
- NELSON, P.E.; TOUSON, T.A.; MARASSAS, W.F.O. **Fusarium Species, An Illustrated Manual for Identification**. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press, 1983.
- PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 29, p. 119-131, 1999.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 135-152, 2000.
- PANDEY, A.; WEBB C.; SOCCOL C. R.; LARROCHE C. **Enzyme Technology**. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, 2005.

PHALIP, V.; GOUBET, F.; CARAPITO, R.; JELTSCH, J.-M. Plant cell wall degradation with a powerful *Fusarium graminearum* enzymatic arsenal. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 573–581, 2009.

PURI, M.; BANERJEE, A.; BANERJEE, U. C. Optimization of process parameters for the production of naringinase by *Aspergillus niger* MTCC 1344. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 195–201, 2005.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, Ltda, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Terceira edição. New York: CSHL Press, 2001.

SAUCEDO-CASTANEDA, G. et al. Maintenance Of Heat And Water Balances As a Scale-Up Criterion For The Production Of Ethanol By *Schwanniomyces Castellii* In A Solid State Fermentation System. **Process Biochemistry**. v. 27, p. 97-107, 1992.

SE-EUN, P.; MEI-HONG, L.; JAE-SUNG, K.; KUMAR, S.; JI-EUN, K.; BONG-SUK, C.; YEON-HEE, Y.; JIN-CHEOL, L.; HYUN-HWA, L.; CHUN-SUNG, K.; SUNG-JUN, K. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Protease from a Culture Supernatant of *Flammulina velutipes* Mycelia. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 71(9), p. 2214-2222, 2007.

SHARMA, R.; CHISTIB, Y.; BANERJEEA, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, p 15-22, 1957.

SOARES, M. M. C. N.; SILVA, R.; GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus sp.* **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 299-303, 1999.

STCKLEIN, W.; SZTAJER, H.; MENGE, U.; SHIMID, R. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1168, p. 181-189, 1993.

UNDERKOFER, L. A.; BARTON R. R.; RENNERT, S.S., Production of Microbial Enzymes and Their Applications. **Appl. Microbiol.**, v. 6, p. 212-221, 1958.

WARD, O. **Biotecnología de La Fermentación: Principios, Procesos e Productos**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A. p. 64-67 e 233-247, 1989.

USO DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR) PARA A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS.

Prof^a. Dr^a. Ione Parra Barbosa Tessmann
Doutoranda Carla Bertechini Faria
Ariadne Riciele Sutil

I - A REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR - *POLYMERASE CHAIN REACTION*)

1 – UM BREVE HISTÓRICO

Com o advento da biologia molecular, a descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi certamente um dos maiores passos das ciências biológicas durante o século XX.

O método foi proposto pela primeira vez no início de 1970 por Har Gobind Khorana como uma estratégia para diminuir o trabalho envolvido na síntese química de genes (Kleppe et al., 1971). Suas idéias, no entanto, não pareciam praticáveis em um momento no qual genes ainda não haviam sido sequenciados; uma DNA polimerase termoestável não era descrita, e a síntese de oligonucleótidos iniciadores era mais uma arte que uma ciência. Não surpreendentemente, as idéias Khorana foram rapidamente esquecidas, até que; em meados da década de 80 a técnica foi concebida e colocada em prática por Kary Mullis (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986). Os experimentos de Mullis foram inovadores pelo fato de ter conseguido uma especificidade na cópia de apenas segmentos específicos do DNA; além disso, introduziu o conceito de iniciador de PCR, e o uso de uma DNA polimerase termoestável. Porém, a realização manual dos ciclos de temperatura, banhando-se uma estante de tubos em vários banhos-maria de temperaturas diferentes, ainda constituía um fator limitante do processo. Nesse sentido, em 1989, o *DNA Thermal Cycler* apareceu como o primeiro termociclador automático; permitindo que a alternância das etapas de aquecimento e resfriamento de cada ciclo da PCR pudesse ser automatizada, eliminando assim, o trabalho manual e tedioso de transferência das amostras entre blocos de aquecimento em diferentes temperaturas (Figura1).

Devido ao impacto científico da técnica da PCR, em 1993, Kary Mullis, foi agraciado com o prêmio Nobel de Química.

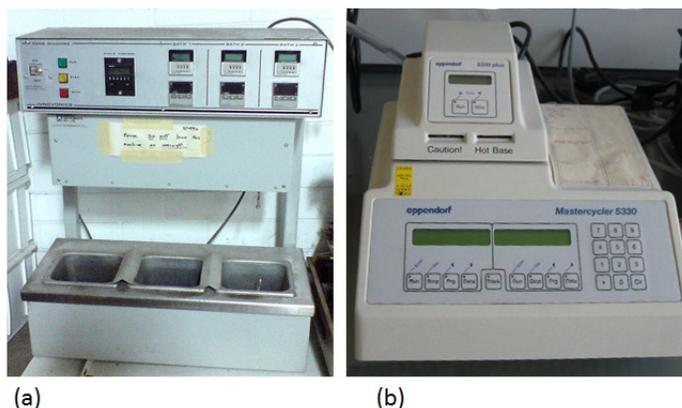


Figura 1: Em (a) um modelo antigo utilizado para ciclagem das temperaturas requeridas na PCR e em (b) um modelo de um termociclador atualmente utilizado na PCR (http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction).

2 – PRINCÍPIOS DA PCR

A reação da polimerase em cadeia consiste de um processo simples, rápido, e altamente sensível que envolve a síntese enzimática *in vitro* de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Dois oligonucleotídeos sintéticos são preparados, complementares às sequências do DNA-alvo em fitas opostas, em posições que definem a extremidade do segmento a ser amplificado. Os oligonucleotídeos servem como iniciadores de replicação que podem ser estendidos pela DNA-polimerase. As extremidades 3' das sonda hibridadas são orientadas umas em direção à outra e posicionadas para iniciar a síntese de DNA sobre o segmento desejado do DNA. O resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência de DNA em bilhões de cópias.

As bases teóricas da PCR envolvem etapas de aquecimento e resfriamento que são repetidas durante o processo de amplificação do DNA molde. Dessa forma, cada ciclo de PCR é constituído de três etapas, que são denominadas: desnaturação, anelamento e extensão. No processo de desnaturação, as fitas do DNA alvo são desnaturadas e separadas através do aquecimento. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida, permitindo a hibridização entre uma das fitas de DNA molde e os oligonucleotídeos iniciadores de sequências complementares que flanqueiam a região alvo a ser amplificada. Dessa forma, uma nova cópia da sequência-alvo pode ser sintetizada na etapa de extensão, por meio da adição de nucleotídeos a

partir de cada terminal 3' dos iniciadores pela DNA-polimerase (Figura 2). Os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, podem ser repetidos de 20 a 40 vezes, e, ao final de cada ciclo, ocorre a duplicação do número de moléculas de DNA, isto é; há uma amplificação exponencial da sequência do DNA-alvo. A amplificação exponencial é dada por 2^n ; onde n corresponde ao número de ciclos na reação, por exemplo: ao término de 20 ciclos haverá 2^{20} cópias de uma região específica de determinada sequência genômica, ou seja, mais de um milhão cópias da porção amplificada do DNA-molde (Figura 3). Esta propriedade da amplificação permite que a reação seja iniciada com quantidades mínimas de DNA (da ordem de picogramas ou nanogramas) e, em seu término, permite que existam grandes quantidades de DNA de uma sequência de interesse.

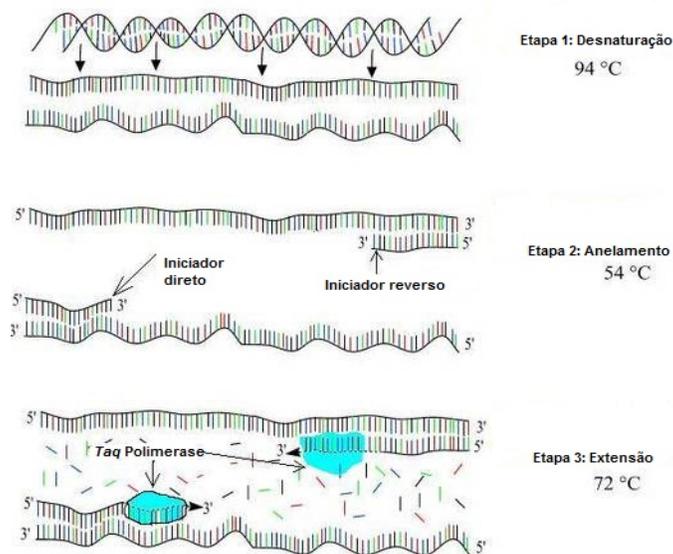


Figura 2: Os três passos envolvidos para amplificação do molde de DNA na reação de PCR (<http://biologia12d.wordpress.com/2010/01/19/polymerase-chain-reaction-pcr/>).

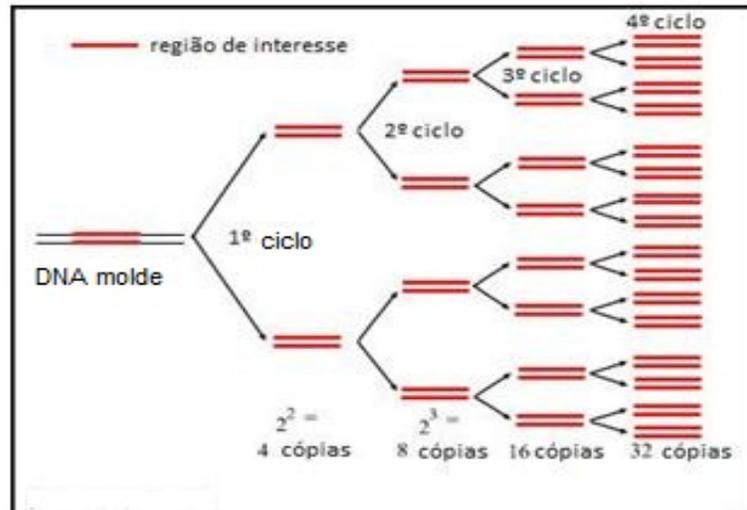


Figura 3: Amplificação exponencial de um gene de interesse em uma reação de PCR (<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>).

3 - A DNA POLIMERASE TERMOESTÁVEL

A introdução de uma DNA polimerase termoestável na PCR foi um dos mais importantes desenvolvimentos em pesquisa genética, e que tornou a PCR uma técnica amplamente utilizada em laboratórios clínicos e de pesquisa. Antes da introdução das enzimas termoestáveis, a DNA polimerase como o fragmento Klenow da DNA polimerase I de *Escherichia coli*, a qual é termolábil, era a enzima utilizada originalmente por Kary Mullis e seguidores iniciais da técnica. Isso significa que uma nova alíquota da enzima tinha de ser adicionada após cada ciclo de desnaturação e de hibridização dos iniciadores, o que tornava o processo demorado, trabalhoso e mais caro, além de proporcionar resultados de baixa qualidade.

Entretanto, em 1969, Thomas Brock e Hudson Freeze da Universidade de Indiana isolaram uma nova espécie de bactéria termofílica a partir de fontes hidrotermais do Parque Nacional de Yellowstone, a qual nomearam *Thermus aquaticus* (Brock e Freeze, 1969) (Figura 4). A habilidade de *Thermus aquaticus* tolerar altas temperaturas conduziu a estudos que proporcionaram a descoberta, isolamento e caracterização de uma DNA polimerase termoestável, que foi denominada, *Taq* DNA polimerase.

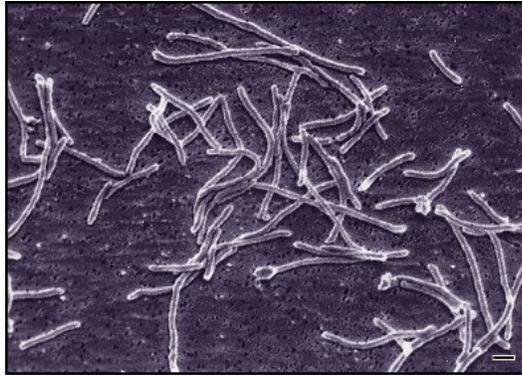


Figura 4: Bactérias termofílicas, *Thermus aquaticus* (http://en.wikipedia.org/wiki/Thermus_aquaticus).

O gene de *Taq* DNA polimerase contém 2.499 nucleotídeos, que codificam uma proteína monomérica de 832 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 94 kD (Kim et al., 1995) (Figura 5).

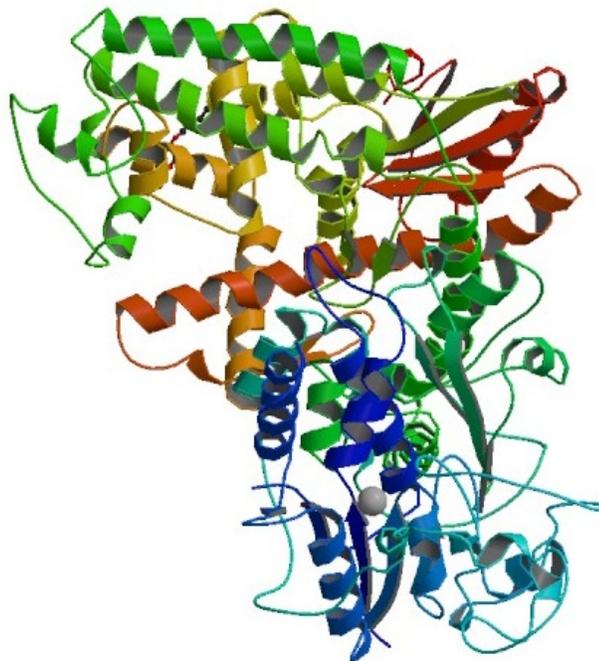


Figura 5: Estrutura tridimensional da enzima *Taq* DNA polimerase de *Thermus aquaticus* obtida a partir de estudos de cristalografia de raios-X (Protein Data Bank: DOI: [10.2210/pdb1taq/pdb](https://doi.org/10.2210/pdb1taq/pdb)).

Como outros membros da família da DNA polimerase I, a *Taq* DNA polimerase é constituída por três domínios: um domínio amino-terminal, um domínio central, e um domínio carboxi-terminal (Kim et al., 1995) (Figura 6).

A região carboxi-terminal também denominada de região de polimerização, tem a forma de uma "mão aberta" cujos "dedos" são capazes de reconhecer as bases do DNA (Figura 6). Esta região é "quase idêntica" ao fragmento de Klenow, o fragmento da proteína DNA polimerase I de *E. coli* que contém a região de polimerização. Em seu mecanismo de catálise, a "mão aberta" de *Taq* DNA polimerase envolve uma cadeia de DNA ligada a um iniciador. Posteriormente, ela sofre uma mudança conformacional para adicionar os nucleotídeos (Kim et al., 1995).

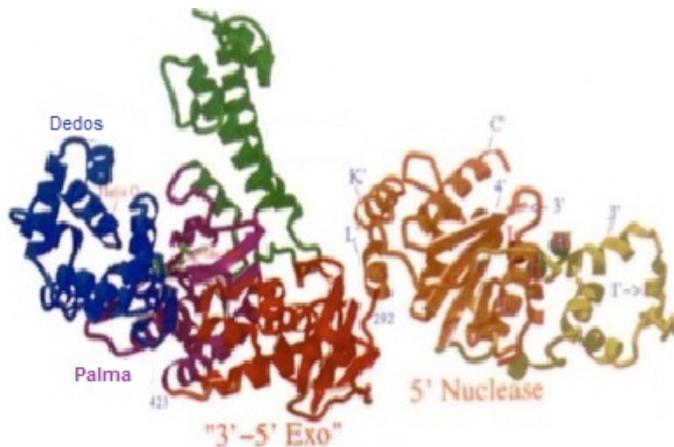


Figura 6: Domínios da enzima *Taq* DNA polimerase. São evidenciadas as estruturas em “formato de mão aberta” do sítio de polimerização (região C-terminal); a região central de atividade exonuclease 3'→5'(não funcional), e a região N-terminal de atividade 5' nuclease (Kim et al., 1995).

A região central (Figura 6) da enzima *Taq* DNA polimerase é uma região que corresponde à região com atividade exonucleásica de 3' para 5' da DNA polimerase I de *E.coli*. De acordo com Kim e colaboradores (Kim et al., 1995), esta região "difere extensivamente" da proteína de *E.coli*, de modo que, na enzima *Taq* DNA polimerase, quatro alças de comprimentos entre 8 e 27 resíduos foram eliminados. Além disso, grupos químicos necessários para a ligação de íons metálicos, e também para a funcionalidade da região, não estão presente. Essas deleções são consistentes com o fato de *Taq* DNA polimerase não poder atuar como uma exonuclease no sentido de 3' para 5', ou seja; esta enzima não apresenta atividade revisora de erros. Isso representa uma desvantagem para a enzima, uma vez que erros incorporados na síntese de uma cadeia de DNA não podem ser corrigidos. Estima-se que a *Taq* DNA polimerase incorpore um nucleotídeo errado a cada 100 replicados.

A região amino-terminal contém o domínio de atividade nucleásica 5'→3'. Esta região é altamente conservada em relação à DNA polimerase I de *E.coli*.

A enzima apresenta uma meia-vida de 40 min a 94 - 95°C, sendo a temperatura ótima para a atividade da enzimática de 75-80°C (Chien *et al.*, 1976). A máxima atividade pode ser verificada em soluções contendo 2-4 mM de MgCl₂ e pH 9,0 a 25°C (Lawyer *et al.*, 1993). O cátion divalente Mg²⁺ atua como cofactor enzimático, que é necessário para a catalisar a síntese de DNA (Chien *et al.*, 1976).

Algumas propriedades das DNA polimerases são essenciais para a amplificação de DNA e sequenciamento, dentre elas, a termoestabilidade, a taxa de extensão, a processividade e a fidelidade. Nesse sentido, outras DNA polimerases termoestáveis de maior processividade e de alta fidelidade foram isoladas de outros organismos e estão comercialmente disponíveis para realização da PCR. Entre elas destacam-se a *Pfx* DNA polimerase isolada de *Thermococcus sp.*, a *Vent_R*® DNA polimerase isolada de *Thermococcus litoralis*; a *Pfu* isolada de *Pyrococcus furiosu*, dentre outras. Portanto, a escolha da enzima a ser utilizada na reação da PCR dependerá do tipo de aplicação que será dada ao fragmento gênico amplificado, por exemplo: aplicações de rotina como o uso de iniciadores espécie-específicos para identificação de espécies, clonagem e/ou sequenciamento.

4 – COMPONENTES ESSENCIAIS PARA A PCR

A reação de PCR necessita de basicamente seis componentes essenciais descritos a seguir.

- **DNA molde:**

A reação sempre parte de um DNA molde, extraído convenientemente da amostra, ou de uma amostra de RNA, convertida à cDNA. Para sucesso da PCR a sequência gênica a ser amplificada deve ser intacta e, além disso, os ácidos nucléicos devem estar livres de impurezas (proteínas, lipídeos, e reagentes de extração, etc). A concentração e a qualidade de DNA influenciam os lucros da reação. De modo geral, no caso de DNA genômico de mamífero, até 1 ug de DNA é utilizado por reação, uma quantidade que contém aproximadamente 3×10^5 moléculas de DNA molde. Os valores típicos para DNAs de leveduras, bactérias, e DNAs plasmidiais utilizados por reação são 10 ng, 1 ng e 1 pg, respectivamente. Uma regra geral que pode ser estabelecida é que 1 ug de uma amostra de DNA de dupla fita com 1Kb contém $9,12 \times 10^{11}$ moléculas de DNA (Sambrook e Russell, 2001).

- **DNA polimerase:**

Em PCRs de rotina a *Taq* DNA polimerase continua sendo a enzima de escolha. São requeridas de 0,5 – 2,5 unidades da enzima para cada 25 – 50 μ L da reação padrão. Normalmente, a maioria das DNA polimerases disponíveis no mercado são fornecidas conjuntamente com uma solução-tampão específica, cuja composição varia de acordo com o fabricante. Basicamente, estas soluções contêm íons diversos (Na^+ , Cl^- , K^+ , entre outros) que aperfeiçoam as condições de reação.

- **Um par de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos:**

Os iniciadores são sequências curtas de oligonucleotídeos (12 a 35 bases) complementares a uma região específica no DNA alvo. Ao se iniciar um estudo, o desenho do iniciador pode ser obtido na literatura ou realizado pelo pesquisador por meio de programas de bioinformática específicos disponíveis no mercado. Em reações padrão, as quantidades típicas de iniciadores variam de 0,1-0,5 mM de cada iniciador (6×10^{12} a 3×10^{13} moléculas). Esta quantidade é suficiente para pelo menos 30 ciclos de amplificação de um segmento de 1kb do DNA (Sambrook e Russell, 2001).

- **Desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs):**

Uma reação padrão de PCR deve conter quantidades equimolares de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Os desoxinucleotídeos são a matéria-prima propriamente dita para a síntese das fitas-filhas. Estes são ligados à fita-mãe pela polimerase em uma área delimitada pelos iniciadores.

- **Cátions divalentes:**

Todas as DNAs polimerases termoestáveis requerem cátions divalentes livres, geralmente o Mg^{2+} , para sua atividade.

- **Solução tampão:**

O tampão mais frequentemente utilizado em PCR é o Tris 10mM, com pH variando entre 8,5 e 9,0 a 25°C. Com o aumento da temperatura pelo termociclador o pH diminui para 7,4, que é um valor ótimo para atividade da *Taq* DNA polimerase na temperatura de 72°C (Sambrook e Russell, 2001).

5 – REGRAS BÁSICAS PARA O DESENHO DE INICIADORES

Na maioria das aplicações da PCR, é a sequência do iniciador que determina o sucesso geral do ensaio. Nesse contexto, algumas propriedades dos oligonucleotídeos que influenciam na eficiência da amplificação devem ser consideradas, com a finalidade

de garantir que a estabilidade e a especificidade na ligação sejam adequadas, dentre elas destacamos:

- Quantidade de C e G deve estar entre 40% e 60%, e ter uma distribuição uniforme ao longo de todo o iniciador. Esta condição garante uma maior estabilidade de hibridização,
- A região do iniciador complementar ao molde deve ter comprimento variando entre 18 e 28 pb. O ideal é que o par de iniciadores não apresente uma variação de mais de três pares de bases entre eles,
- Regiões contendo sequências palindrômicas devem ser evitadas,
- Ausência de complementariedade entre as extremidades 3' para que seja evitada a formação de dímeros de iniciadores,
- A temperatura de anelamento (T_m) dos iniciadores direto e reverso deve ser mantida próxima e não muito baixa, para que a ligação inespecífica seja evitada. Temperaturas de anelamento entre 55°C e 80°C são desejáveis,
- A extremidade 5' dos iniciadores deve conter grampos de CG,
- Deve existir um único sítio de pareamento no DNA molde onde ocorre a ligação do iniciador, o que significa que a sequência do iniciador é única dentro da sequência do DNA.

- Cálculo da temperatura de anelamento (T_m) entre iniciadores e sua sequência alvo

A temperatura de anelamento, fusão, ou temperatura de *melting* (T_m), corresponde à temperatura em que metade das fitas de DNA estão hibridizadas (ou seja, ligada ao iniciador correspondente), e outra metade não está hibridizada.

Há várias equações para cálculo da temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos e a sequência alvo complementar, no entanto, uma fórmula empírica e convenientemente conhecida como “A regra de Wallace” pode ser utilizada para calcular a temperatura de fusão, e é dada pela seguinte fórmula: T_m (°C) = 2(A+T) + 4(G+C) (Thein e Wallace, 1986). Cálculos mais exatos levam em conta a variação de energia livre (ΔG°) de cada ligação de hidrogênio entre os pares A+T e G+C, além do número de nucleotídeos. Muitos laboratórios utilizam temperaturas de anelamento de 3 °C a 5 °C abaixo da T_m dos iniciadores calculada usando-se a fórmula mais simples como início para os experimentos de otimização da PCR.

Alguns programas também são disponíveis para o desenho e cálculo da temperatura de fusão de iniciadores, dentre eles citamos: Primer 3, Oligo (Life Science Software), BioMath (Promega), e GeneFisher Primer, dentre outros.

6 – CONTROLE DE CONTAMINANTES

Como a PCR é muito sensível, contaminações com pequenas quantidades de material exógeno podem resultar na sua amplificação. A contaminação pode ser de origem laboratorial, por exemplo; sequências previamente amplificadas; ou de origem externa, por exemplo, DNA do operador. Para minimizar os problemas de contaminação os seguintes cuidados são indicados:

- (a) Preparar a reação em um laboratório isolado ou, pelo menos, em área especialmente designada do laboratório para o preparo da PCR;
- (b) Manter equipamentos e reagentes para uso na PCR separadamente do equipamento geral do laboratório e, principalmente, dos reagentes usados para a análise de produtos de PCR;
- (c) Manter estéreis todos os reagentes que podem ser autoclavados e dividir as soluções-estoque em alíquotas para armazenamento em quantidades reduzidas;
- (d) Preparar uma pré-mistura contendo todos os componentes da reação com exceção da DNA polimerase e do DNA-molde (que devem ser adicionados por último);
- (e) Usar luvas descartáveis durante o preparo da PCR;
- (f) Incluir controles negativos, para verificar possíveis contaminações, e controles positivos com amostras usadas previamente para confirmar a funcionalidade da mistura de reação previamente preparada (Erlich et al., 1991; Sambrook e Russell, 2001).

7 – INIBIDORES DA REAÇÃO

Praticamente qualquer coisa poderá inibir PCRs se presente em excesso. Os culpados mais comuns são: proteinase K (que podem degradar a DNA polimerase), fenol, e EDTA (Sambrook e Russell, 2001).

8 - OTIMIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS PARA PCR

A padronização de um protocolo de PCR pode significar uma série de testes, onde se pode alterar a concentração dos reagentes básicos, adicionar algum potencializador, assim como alterar as condições de amplificação, principalmente a temperatura de anelamento e o tempo de alongamento da nova fita de DNA formada. Além disso, a concentração e a pureza do DNA molde, e a concentração de Mg^{2+} devem ser consideradas.

O excesso de Mg^{2+} livre provoca a redução da fidelidade enzimática e aumento de produtos não específicos; enquanto, a ausência ou pouca quantidade de Mg^{2+} mantém inativas as DNA polimerases termoestáveis.

Alguns reagentes podem ser utilizados para aumentar a especificidade da reação como: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenoglicol (PEG), betaína e formamida. Algumas amidas de baixo peso molecular também têm potencial para aumentar a especificidade da PCR (Kramer e Coen, 2001).

9 - COMO VISUALIZAR O PRODUTO DA REAÇÃO

Finalizada a PCR, o próximo passo é detectar a presença de produtos amplificados. Em geral, isso é realizado pela eletroforese em gel de agarose (Figura 7).

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. Os ensaios de eletroforese se valem do princípio que determina que a carga global de uma fita de DNA é negativa. Portanto, uma solução que possua íons livres (eletrolítica) e que tenha moléculas de DNA em suspensão pode ser separada aplicando-se uma dada voltagem. Ao final do processo as cadeias de DNA estarão próximas ao cátodo (positivo), atraente de moléculas de cargas negativas. A distância que o fragmento percorreu a partir do ponto de aplicação é comparada com a distância que outros fragmentos de tamanhos conhecidos (marcadores de tamanho molecular) percorreram no mesmo gel. Os marcadores de tamanho molecular (*Ladders*) são misturas de trechos de DNA com tamanhos variáveis, normalmente equidistantes entre si. Por exemplo, um *Ladder* de 50bp quer dizer na prática que ele mostrará várias bandas, cada uma maior 50 pares de base do que a anterior (50bp, 100bp, 150bp, 200bp, 250bp...).

Após a corrida, os ácidos nucleicos podem ser visualizados no gel, pelo uso do brometo de etídeo, um corante fluorescente. Este composto intercala-se entre os pares de bases empilhados da molécula de DNA/RNA e apresenta fluorescência quando excitado com radiação ultravioleta (figura 7).

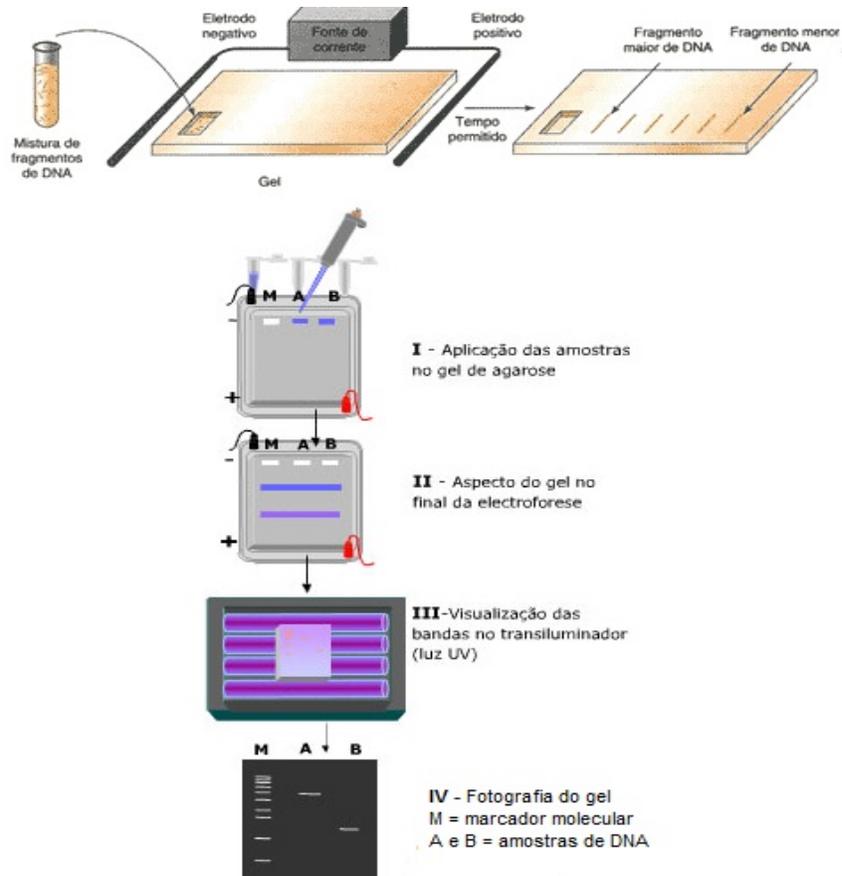


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. (<http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Biotecnologia/eletroforese.php>)

10 - VARIÁVEIS DA TÉCNICA

Poucos anos depois do surgimento da técnica de PCR, variações do protocolo básico da técnica foram desenvolvidas com uma variedade de objetivos. Algumas dessas técnicas são citadas a seguir.

A técnica de PCR precedida de transcrição reversa (**RT-PCR**, do inglês, **Reverse Transcription-PCR**) parte de um RNA-molde que é convertido em DNA complementar (cDNA) usando uma transcriptase reversa (RT, do inglês, *reverse transcriptase*). O produto da RT, isto é, o cDNA, é a seguir submetido à PCR como DNA-molde. A RT-PCR é uma ferramenta muito sensível para estudos de expressão gênica em nível de

RNA, especialmente na quantificação de RNA mensageiro (mRNA) ou de níveis de RNA viral.

A “*PCR multiplex*” consiste de múltiplos pares de iniciadores dentro de uma única mistura de PCR para produzir amplicons de tamanhos variados correspondentes à sequências de DNA diferentes. Esta vantagem pode simplificar alguns experimentos, reduzindo tempo e trabalho.

A PCR convencional não permite a estimativa exata de valores quantitativos. Por esta razão, foi desenvolvida a *PCR em tempo real* ou PCR quantitativa (*qPCR*), que permite realizar a avaliação da quantidade de produto formado durante o curso da reação pelo monitoramento da fluorescência de corantes ou sondas introduzidas na reação. A fluorescência é proporcional à quantidade de produto formado, e permite registrar o número de ciclos de amplificação necessários para obter uma determinada quantidade de moléculas de DNA. Os usos típicos da PCR em tempo real incluem a detecção de patógenos, análises da expressão gênica, análises de polimorfismo de base única (SNP), e análises de aberrações cromossômicas.

A “*hot-start PCR*” foi desenvolvida ao observar-se que a mistura de todos os reagentes da PCR antes da etapa de desnaturação inicial proporcionava maiores oportunidades de ligações não específicas dos iniciadores com regiões do DNA-molde. A utilização de uma DNA polimerase ligada a um anticorpo termosensível, isto é, que se desnatura no primeiro ciclo de desnaturação e permite a ativação da enzima, reduz essa possibilidade de amplificar produtos indesejados. Como alternativa à DNA polimerase conjugada a anticorpo, pode-se realizar a adição de enzima após a desnaturação inicial. Embora permita resultados semelhantes à “*hot-start PCR*”, esta prática requer maior manipulação e, conseqüentemente, consumo de materiais e tempo (Arezi et al., 2003).

Na “*nested PCR*”, dois conjuntos de iniciadores são utilizados em duas PCRs sucessivas (Figura 8). Os produtos de uma reação de amplificação inicial são diluídos e utilizados como molde para uma segunda PCR, na qual é utilizado outro conjunto de iniciadores correspondentes às sequências localizadas próximas, mas, internas àquelas utilizadas na primeira reação. A *nested PCR* aumenta a especificidade de amplificação do DNA sendo indicada para a amplificação de seguimentos de DNA longos, porém a técnica exige conhecimento detalhado da sequência-alvo.

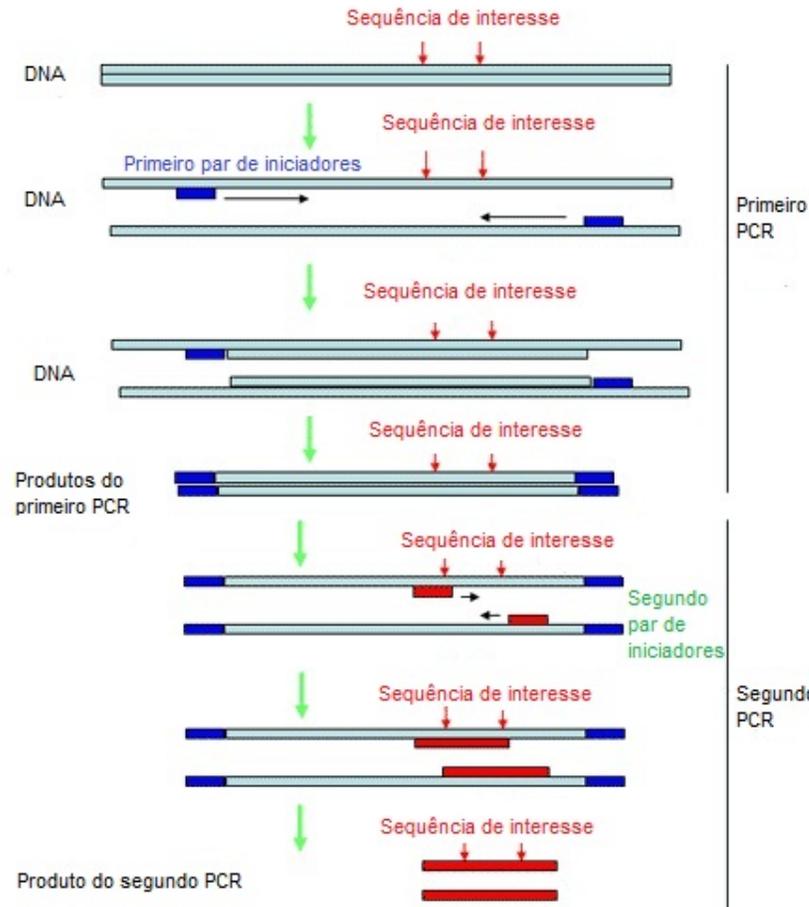


Figura 8: Diagrama ilustrativo do método de *Nested PCR* (<http://www.pcrstation.com/nested-pcr/>).

11 - APLICAÇÕES DA PCR

A PCR tem sido amplamente aplicada em várias áreas de pesquisa em genética molecular. Ela pode ser usada para clonar diretamente quaisquer fragmentos de DNA para os quais seja possível projetar iniciadores flanqueadores.

O sequenciamento de DNA também pode ser feito por PCR. O sequenciamento de fragmentos de DNA ajuda na identificação de espécies, e também, na avaliação direta de polimorfismos de DNA que pode fornecer dados para estudos de inferências filogenéticas e determinação de relações de parentesco entre indivíduos e populações.

Um sítio de sequência de etiqueta (do inglês, *sequence - tagged sites* ou *STS*) é uma sequência de DNA curta (200 a 500 pares de bases) de única ocorrência no genoma e cuja localização e sequência de bases são conhecidas. As STSs podem ser facilmente detectadas pela reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores específicos. Por

essa razão elas são úteis para a construção de mapas genéticos e físicos a partir de dados de sequência relatados por muitos laboratórios diferentes.

Uma aplicação comum da PCR é o estudo dos padrões de expressão de um gene. Tecidos (ou até mesmo células individuais) podem ser analisados em diferentes etapas para avaliar quais genes tornaram-se ativos, ou que foram desligados. Nesta aplicação também se pode utilizar um PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para quantificar os reais níveis de expressão gênica.

Várias doenças de origem genética, como distrofia muscular de Duchene, β -talassemia, doença de Huntington, doença de Tay-Sachs, fibrose cística, hemocromatose hereditária, hemofilia, síndrome de Lesch-Nyhan, podem ser diagnosticadas pela PCR (Kim et al., 2002).

A técnica também possibilita o diagnóstico de infecções virais, bacterianas e aquelas causadas por protozoários de maneira rápida e precisa. Alguns patógenos que podem ser identificados incluem *Chlamydia trachomatis*, Citomegalovírus, Enterovírus, *Haemophilus influenza*, *Herpes simplex*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, Papiloma Vírus (HPV), *Plasmodium* sp., *Toxoplasma gondii*, *Varicella zooster*, Vírus da Hepatite B, Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), além de outros (Yang 2004; Speers, 2006).

A sensibilidade extrema da PCR tem grande uso na medicina forense, pois permite a determinação de traços mínimos de evidências biológicas (manchas de sangue, sêmen, cabelos, etc.) que são frequentemente encontradas em cenas de crimes. A partir destas amostras, é possível gerar-se uma “impressão digital de DNA” (do inglês, *DNA fingerprinting*) do indivíduo da qual a amostra é proveniente (Walsh, 2004).

A técnica é também importante para responder a questões científicas básicas. No campo da biologia da evolução, a PCR é utilizada para estabelecer relações entre as espécies. Em antropologia, tem sido usada para compreender antigos padrões de migrações humanas. Na arqueologia, tem sido utilizada para ajudar a identificar restos humanos antigos. Os paleontólogos têm utilizado a PCR para amplificar DNA de insetos extintos há 20 milhões de anos e que ficaram preservados em âmbar. O Projeto Genoma Humano, que teve o objetivo de determinar a sequência dos três bilhões de pares de bases no genoma humano, dependeu fortemente da PCR.

II - A REAÇÃO DE PCR NA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

Devido a sua especificidade e sensibilidade, a PCR é uma ferramenta poderosa, para o diagnóstico de fungos, pois permite a detecção de moléculas de ácidos nucleicos desses organismos, mesmo em pequenas quantidades. Existem vários exemplos de testes baseados em PCR desenvolvidos para a detecção de fungos em plantas, alimentos e em patologias médicas. A PCR pode ser utilizada para detectar grupos de linhagens, espécies ou taxa superiores.

No entanto, para a detecção de um dado fungo em qualquer tipo de amostra são necessários iniciadores que propiciem a amplificação de um gene ou segmento gênico específico daquela espécie. Assim, o desenvolvimento de procedimentos de diagnóstico baseados em PCR requer o conhecimento de sequências de nucleotídeos de pelo menos parte da região alvo a fim de que iniciadores específicos possam ser desenhados.

Em tempos de globalização da economia, aspectos gerais de qualidade e principalmente higiênico-sanitários são fundamentais na definição da aceitação e da recomendação de quaisquer produtos, especialmente os destinados à alimentação humana. A ocorrência de fungos como contaminantes em produtos agrícolas, alimentos e rações, tem sido assunto de investigação.

Estima-se que 25% da produção anual de alimentos derivados de plantas são deteriorados por fungos. Além das perdas econômicas na produção de cereais, grande maioria dos fungos que contaminam alimentos produz micotoxinas, as quais, são metabólitos secundários tóxicos que prejudicam a saúde humana e animal. Essa situação demonstra a importância do uso métodos apropriados para detecção e controle desses microrganismos em produtos alimentares.

As técnicas tradicionais para a identificação de fungos em alimentos são pouco sensíveis, laboriosas, dependentes de cultivo, e da experiência do analisador. Além disso, detectam apenas a presença de células viáveis. Ao contrário, o uso da PCR permite diagnosticar esses microrganismos de forma sensível, específica e rápida, mesmo que eles se encontrem inviáveis.

- Reação de PCR para a identificação molecular de *Fusarium verticillioides* e *Fusarium subglutinans* em milho.

Fusarium verticillioides e *Fusarium subglutinans* são fungos filamentosos do filo *Ascomycota*. Esses são importantes patógenos do milho, e estão comumente

associados com a podridão da haste e da espiga, o que leva à grandes perdas na produção. Além disso, as espécies de *Fusarium* podem causar sérias doenças em animais e humanos devido à produção de micotoxinas.

Considerando que o milho é um cereal de grande importância econômica e alimentar no Brasil e em outros países e que *Fusarium verticillioides* e *F. subglutinans* causam grandes perdas na produção, um método para a detecção rápida e específica desses patógenos, é significativa. Para isso, pares de iniciadores direcionados para o gene da galactose oxidase de cada fungo foram obtidos, e reações de PCR foram padronizadas.

A enzima galactose oxidase catalisa a oxidação de álcoois primários para aldeídos correspondentes, com a concomitante redução do oxigênio a peróxido de hidrogênio. Ela é uma proteína extracelular secretada pelas seguintes espécies de fungos filamentosos: *Fusarium austroamericanum*, isolados do complexo *Giberella fujikuroi* como *Fusarium subglutinans*, e por *Fusarium acuminatum*. A galactose oxidase apresenta as seguintes aplicações biotecnológicas: determinação da concentração de galactose, síntese de aldeídos e carboidratos, estudos de histoquímica e diagnóstico de câncer.

Trabalhos recentes realizados em nosso laboratório levaram à identificação e clonagem de dois genes da galactose oxidase em *Fusarium spp.*: um gene de *Fusarium verticillioides* e um de *F. subglutinans* (Cordeiro et al., 2009). A partir da sequência obtida destes genes, foi possível o desenho dos iniciadores específicos.

– Desenho dos iniciadores

Inicialmente, os genes da galactose oxidase de *F. verticillioides* e de *F. subglutinans* (Cordeiro et al., 2009) e de *F. austroamericanum* (McPherson et al., 1992; GenBank AN M86819) foram alinhados com uso do programa ClustalW (Figura 9). Regiões de baixa similaridade foram escolhidas para o desenho de iniciadores específicos para a identificação molecular de *F. verticillioides* e de *F. subglutinans*. Dois pares de iniciadores foram inicialmente desenhados, um direcionado para o gene da galactose oxidase de *F. verticillioides* (FVFW1/FVRV) e outro para o gene de *F. subglutinans* (FSFW1/FSRV). Estes iniciadores amplificam um fragmento de DNA de

649 pb. Posteriormente, outros iniciadores diretos (FVFW2 e FSFW2) foram desenhados para parear com o iniciador reverso inicialmente desenhado para cada gene, resultando em um fragmento amplificado de 370 pb (Figura 9, Tabela 1).

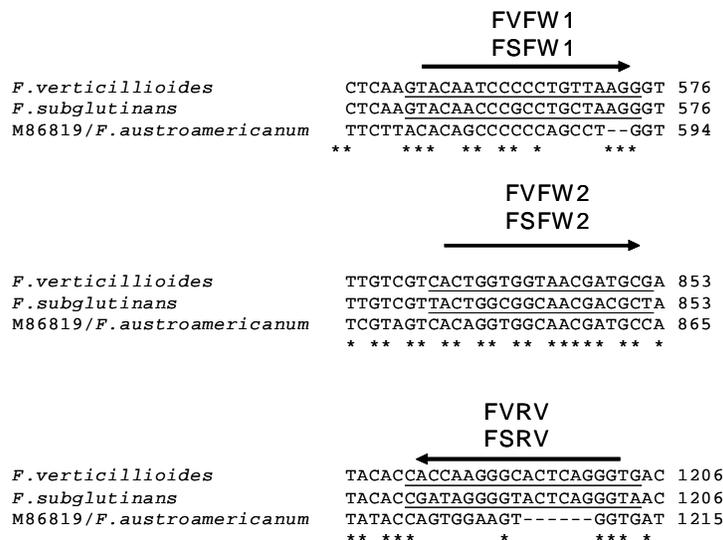


Figura 9: Desenho dos iniciadores. Alinhamento ClustalW de porções do gene da galactose oxidase de *F. verticillioides*, de *F. subglutinans* e de *F. austroamericanum* (genBank NA 86879) e localização dos iniciadores desenhados. A orientação dos iniciadores está indicada pelas flechas (Faria et al., 2012).

Tabela 1– Sequência de Iniciadores

Pares de iniciadores	Sequência dos iniciadores	Referência	Temperatura de anelamento
FVFW1 FVRV	5'-GTACAATCCCCCTGTTAAGG 5'-CACCTGAGTGCCCTTGGTG	Faria et al., 2012	62°C
FVFW2 FVRV	5'-CACTGGTGGTAACGATGCG 5'-CACCTGAGTGCCCTTGGTG	Faria et al., 2012	64°C
FSFW1 FSRV	5'-GTACAACCCGCCTGCTAAGG 5'-TACCCTGAGTACCCCTATCG	Faria et al., 2012	62°C
FSFW2 FSRV	5'-TACTGGCGGCAACGACGCT 5'-TACCCTGAGTACCCCTATCG	Faria et al., 2012	62°C

III. ATIVIDADES PRÁTICAS

- A-) Obtenção dos microrganismos
- B-) Extração do DNA
- C-) Reação de PCR
- D-) Eletroforese em gel de agarose

A-) Obtenção dos microrganismos:

- 1.) Seis sementes de milho apresentando sintomas de podridão serão incubadas por um minuto em uma solução contendo 0,2% de cloro ativo, lavadas duas vezes com água destilada estéril e, então, inoculadas em uma placa de 10 mm de diâmetro contendo Agar verde de malaquita (Castellá et al., 1997) (peptona 15 g/L, KH_2PO_4 1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, verde de malaquita oxalato 2,5 mg/L, Agar 20 g/L) suplementado, após esterilização em autoclave, com 349.000 UI/L de penicilina e 145 UI/L de estreptomina. As sementes nas placas serão incubadas por um período de quatro a cinco dias a 25°C, com período de 12 horas de luz.
- 2.) Após germinação, micélio e conídios de colônias de cor pêssego ou violeta de sementes infectadas de cada placa serão transferidas para placas de petri contendo meio de folhas de cravo (“Carnation Leaf-piece Agar”- CLA) (Leslie e Summerell, 2006), preparado com pedaços de folhas de cravo esterilizadas em autoclave colocados sobre Agar água 2% em placas de petri, as quais serão incubadas por um período de sete dias a 25°C, com período de 12 horas de luz.
- 3.) Para o isolamento monospórico, um fragmento de folha de cravo bem colonizado da cultura em CLA será picotado e agitado em 20 mL de água destilada estéril. Cem μL da suspensão obtida serão espalhados na superfície de uma placa de 10 cm de diâmetro contendo Agar-água 2,5%. A placa será incubada por 18 a 24 horas, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Em seguida, com o auxílio de uma lupa, será removido um fragmento do meio contendo apenas um esporo, ou fragmento de hifa em germinação, o qual será transferido para um tubo com meio BDA inclinado. Este tubo será incubado por cinco a sete dias, nas mesmas condições, e as características culturais serão observadas.
- 4.) Para a análise morfológica dos isolados, será realizada uma análise de microcultivo, onde os isolados serão inoculados em um bloco de um cm^3 de meio Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) contendo KH_2PO_4 1g/L, KNO_3 1g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, KCl 0,5 g/L, glicose 0,2 g/L, sacarose 0,2 g/L, Agar 20 g/L (Leslie e Summerell, 2006).O bloco de SNA será colocado entre lâmina e lamínula em placa de petri, com ambiente úmido proporcionado por um pedaço de algodão embebido em água estéril. A

incubação será feita por dois dias, a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. As lâminas serão observadas em microscópio ótico.

Observações: A atividade para obtenção dos microrganismos será demonstrada etapa à etapa e realizada mediante o preparo prévio dos meios de cultivo e inóculos, tendo como objetivo demonstrar técnicas microbiológicas para isolamento e obtenção de culturas puras de fungos.

B-) Extração de DNA: (Método descrito por Koenig et.al, 1997 com algumas modificações).

Procedimentos:

- 1-) Crescer os isolados em meio líquido de batata-dextrose por 5 dias a 22°C - 25°C.
- 2-) Separar a massa micelial do meio líquido através de filtração em gaze estéril.
- 3-) Macerar o micélio em nitrogênio líquido em um grau com pistilo, reduzindo o micélio a um pó fino.
- 4-) Transferir o fino pó de micélio para tubos Eppendorf (aproximadamente 300 µL e adicionar o tampão de extração de DNA na proporção de 700 µL para cada 300 µL de micélio macerado. O tampão de extração consiste de uma mistura de: tampão lise do núcleo, tampão de isolamento do DNA e solução de sarcosina 5% na proporção de 1:1:0,4 (o preparo destes reagentes está descrito abaixo). Adicionar bissulfito de sódio ao tampão de extração na proporção de 3,8 mg/mL.
- 5-) Manter os tubos em banho-maria a 65°C por 60 minutos. Durante a incubação agite os tubos a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão.
- 6-) Retirar os tubos do banho-maria e fazer a extração com solvente orgânico; adicionando 500 µL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico, na proporção de 24:1, em cada tubo. Agite os tubos durante 5 minutos, invertendo-os no mínimo 20 vezes até formar uma emulsão.
- 7-) Centrifugar as amostras a 12.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente e transferir com uma pipeta o sobrenadante (fase aquosa, aproximadamente 700 µL) para

tubos limpos. Retire os tubos da centrífuga cuidadosamente, evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas.

8-) Adicionar 5 μL de uma suspensão contendo 20 mg/mL de RNase em cada tubo contendo a fase aquosa e incubar em banho-maria a 37°C por 30 minutos.

9-) Adicionar 5 μL de uma suspensão contendo 20 mg/mL de Proteinase K e incubar por 30 minutos a 56°C.

10-) Adicionar 700 μL de isopropanol em cada tubo e agitar gentilmente para precipitar o DNA. Se o precipitado branco não for visível siga em frente mesmo assim, e para aumentar a quantidade de precipitado, os tubos devem ser mantidos por 60 minutos ou mais (overnight) a temperatura de -20°C.

11-) Centrifugar os tubos a 12.000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante cuidando para não perder o pellet.

12-) Adicionar 500 μL de etanol 70% para lavar o pellet. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos e descartar o etanol.

13-) Adicionar 500 μL de etanol 70% para lavar novamente o pellet. Centrifugar novamente a 12.000 rpm por 5 minutos e descartar o etanol.

14-) Secar o pellet assim como as paredes internas do tubo em temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos.

15-) Quando o etanol evaporar totalmente, adicionar 100 μL de TE (Tris pH 8.0, 10 mM e EDTA 1mM) para ressuspender o pellet. Transferir os tubos para um refrigerador a 4°C

16-) A qualidade e a quantidade do DNA das amostras pode ser determinada por meio de corrida em gel de agarose 0,7 – 1% e pela leitura de absorbância. Quando a proporção entre as de absorbância a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) for próxima de 2, significa que a amostra tem boa qualidade. A ausência de smear na corrida da amostra de DNA em gel de agarose é um indicador de que o DNA da amostra não está fragmentado.

A quantificação do DNA presente na amostra pode ser feita pela fórmula:

$$\mu\text{g}/\mu\text{L DNA} = (\text{fator de diluição da amostra} \times 50 \times \text{Abs}_{260}) / 1000$$

-Adicionar 5 μL da amostra a 195 μL de água (diluição de 40X) e ler a absorbância.

Preparo dos reagentes para extração de DNA:

-Tampão de lise do núcleo (Tris pH 7,5 0,2 M; EDTA 50 mM e CTAB 2%)

Trisma base.....2,42 g

EDTA.....1,861 g

CTAB..... 1 g

Ajustar o pH para 7,5 com HCl, completar o volume para 100 mL de H₂O e autoclavar.

-Tampão de isolamento do DNA (Tris pH 7,5 0,1M; EDTA 5 mM e sorbitol 0,35 M)

Trisma base.....1,21 g

Sorbitol.....6,38 g

EDTA.....0,1861 g

Ajustar o pH para 7,5 com HCl, completar o volume para 100 mL de H₂O e autoclavar.

-Solução de sarcosina 5%: 0,5g de sarcosina para 10 mL de H₂O, autoclavar.

-Tampão de Extração: para 10 amostras preparar 9,6 mL

1 volume de tampão de isolamento do DNA..... 4 mL

1 volume de tampão de lise do núcleo.....4 mL

0,4 volume de solução de sarcosina 5%.....1,6 mL

Adicionar 38 mg (0,038g) de bissulfito de sódio para cada 10 mL de tampão de extração. Preparar somente no momento do uso.

-Clorofórmio: Álcool isoamílico (24:1) = Para 10 amostras preparar 6,25 mL

	para 25 mL	para 12,5 mL	para 6,25 mL
Clorofórmio	24 mL	12 mL	6 mL
Álcool isoamílico	1 mL	0,5 mL	0,25 mL

-Tampão TE pH 8,0 (Tris HCl (pH 8,0) 10 mM e EDTA 1mM)

Tris.....0,121 g

EDTA.....0,037 g

Corrigir pH para 8,0, completar o volume para 100 mL de H₂O e autoclavar.

C-) Reação de PCR:

Procedimentos:

1. Para uma reação, pipetar as seguintes soluções em um microtubo de 0,5 mL estéril:

Água miliQ.....14,95 µL
Tampão (10X)2,5 µL
dNTPs (10 mM) 0,5 µL
Iniciador direto (25 pmol/µL).....1,0 µL
Iniciador reverso (25 pmol/µL).....1,0 µL
MgCl₂ (50 mM)..... 0,75 µL
Taq DNA-polimerase (1 U/µl)..... 0,3 µL
DNA molde (100 ng/µl)..... 4 µL

Volume total..... 25 µL

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

94°C/ 5 min - Temperatura Inicial/Denaturação do DNA

25 ciclos: (desnaturação/anelamento/extensão)

94°C/ 1 min e 30 seg - Denaturação

64°C/ 1 min e 30 seg - Temperatura de anelamento dos iniciadores

72°C/ 2 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%.

D-) Eletroforese em gel de agarose:

Materiais:

Tampão TAE 50 X

Tris Base.....30,25 g
Ácido acético glacial.....7,14 mL
EDTA.....2,325 g
H₂O q.s.p.....125 mL

Tampão de corrida: Diluir 5 mL do tampão TAE 50 X em 250 mL de H₂O

Corante de carregamento do gel (6X):

Azul de bromofenol.....	0,0025 g
Xileno de cianol.....	0,0025 g
Glicerol	300 µL
H ₂ O.....	700 µL

Brometo de etídeo (10 mg/mL): Pesar 0,002g de brometo de etídeo e diluir em 200 µL de água.

Procedimento para preparo de gel de agarose 1,5%:

Em um kitasato misture:

Agarose.....	0,6g
Tampão TAE 50 X.....	800 µL
H ₂ O q.s.p.....	40 mL

1. Aqueça no microondas por um minuto para derreter a agarose. Agite a solução, e repita o aquecimento por mais um minuto
2. Adicione 1,5 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL)
3. Verta sobre a cuba previamente vedada e com o pente desejado. Espere solidificar.

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.

Preparo das amostras:

Misturar nesta proporção: 10 µL de amostra com 2 µL do corante de carregamento do gel (6X)

Preparo do marcador: 9 µL de tampão TE, 1 µL do marcador, 2 µL de corante de carregamento.

Eletroforese:

1. Após a solidificação do gel, remova o pente e coloque o mesmo na posição de corrida na cuba
2. Cubra o gel com o tampão de corrida e carregue as amostras
3. Corra o mesmo por aproximadamente 30 minutos, com no máximo, 100V
4. Acompanhe a corrida pela migração dos corantes.
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). Usar óculos de acrílico com proteção UV.

REFERÊNCIAS

- AREZI, B.; XING, W.; SORGE, J. A.; HOGREFE, H. H. **Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases.** Anal. Biochem., 321:226–235, 2003.
- BROCK, T. D. AND FREEZE, H.. ***Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile.** J. Bacteriol., 98(1): 289–297, 1969.
- CASTELLÁ, G.; BRAGULAT, M.; RUBIALES, M. V.; CABAÑES, F. J.. **Malachite green agar, a new selective medium for *Fusarium*.** Mycopathol., 137:173-178, 1997.
- CHIEN, A.; EDGAR, D.B.; TRELA, J.M.. **Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*.** J. Bacteriol., 127:1550-1557, 1976.
- ERLICH, H. A.; GELFRAND, D.; SNINSKY, J. J.. **Recent Advances in the polymerase Chain Reaction.** Science, 292:1643-1651, 1991.
- FARIA, C. B. ; ABE, C. A. L.; SILVA, C. N. ; TESSMANN, D. J. and Barbosa-Tessmann, I. P. . **New PCR Assays for the Identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and Other Species of the *Gibberella fujikuroi* Complex.** Int. J. Mol. Sci., 13(1):115-32, 2012.
- CORDEIRO, F.A.; FARIA, C. B.; and BARBOSA-TESSMANN, I. P. . **Identification of new galactose oxidase genes in *Fusarium spp*.** J. Basic. Microbiol., 50(6):527-37, 2010.
- KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, R.; MOLINEUX, I.; KHORANA, H.G.. **Studies on polynucleotides. XCVI: repair replications of short synthetic DNA as catalyzed by DNA polymerases.** J. Mol. Biol., 56(2):341-61,1971.
- KIM, Y.; EOM, S.H.; WANG, J.; LEE, D.; SUH, S.W.; STEITZ, T.A.. **Crystal Structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase.** Nature, 376: 612-616, 1995.
- KIM, Y.; FLYNN, T. R.; DONOFF, R. B.; WONG, D. T. W.; TODD, R.. **The Gene: The Polymerase Chain Reaction and Its Clinical Application.** J. Oral. Maxillofac. Surg., 60:808-815, 2002.
- KOENIG, R. L.; PLOETZ, R. C.; KISTLER, H. C.. ***Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* consists of a small number of divergent and globally distributed clonal lineages.** Phytopathol., 87: 915-923, 1997.
- KRAMER, M. F.; COEN, D. M. **Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization.** Current Protocols in Molecular Biology, 2001.
- LAWYER, F.C.; STOFFEL, S.; SAIKI, R.K.; CHANG, S.; LANDRE, P.A.; ABRAMSON, R.D.; GELFAND, D.H.. **High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity.** Genome Research; 2: 275-287, 1993.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.

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.

SAIKI, R.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.; HORN, G.; ERLICH, H.; ARNHEIM, N. **"Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia"**. Science, 230 (4732): 1350-1354, 1985. [doi: 10.1126/science.2999980](https://doi.org/10.1126/science.2999980)

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Terceira edição. CSHL Press, 2001.

SPEERS, D. J.. **Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases**. Clin. Biochem. Rev; 27: 39-51, 2006.

THEIN, S.L. AND WALLACE, R.B.. **The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders**. In: Human Genetic Diseases: A Practical Approach (Davis, K.E., ed.), IRL Press, p. 33–50, 1986.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E.. **PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings**. Lancet. Infect. Dis., 4: 337-348, 2004.

WALSH, S. J.. **Recent advances in forensic genetics**. Expert. Rev. Mol. Diagn., 4 (1): 31-40, 2004.

ISOLAMENTO E MEDIDAS DE ATIVIDADES DE MITOCONDRIAS ANIMAIS E VEGETAIS: UMA ABORDAGEM COMPARATIVA

Dra. Emy luzia Ishii-Iwamoto
Dra. Clairce luzia Salgueiro
Eduardo Hideo Gilgioni
Kátia Kern
Lilian Brites Campos
Márcio Mito

A compartimentalização celular

Uma das características das células eucarióticas é que as vias metabólicas estão compartimentalizadas em várias organelas subcelulares. O entendimento da fisiologia celular não pode, evidentemente, prescindir de experimentos com células inteiras ou mesmo grupos de células. No entanto, é verdade também que somente a separação dos diversos componentes pode fornecer os dados primários indispensáveis para uma correta interpretação dos dados obtidos de experimentos com células intactas. A separação das diversas frações celulares, por outro lado, dependeu e ainda depende de técnicas de centrifugação.

Fracionamento celular

A separação dos componentes celulares pode ser obtida por centrifugação fracionada. Esta técnica baseia-se no uso sucessivo de diferentes velocidades de centrifugação as quais, por sua vez, geram diferentes acelerações centrífugas. A velocidade necessária para obter a sedimentação de determinada fração subcelular pode ser previamente determinada com base nos valores dos coeficientes de sedimentação de cada fração.

Os valores dos coeficientes de sedimentação, em geral expressos como unidades de 10^{-13} s que são conhecidas como Svedberg (S), podem ser determinados previamente em uma centrífuga analítica ou através de dados disponíveis na literatura especializada. Este coeficiente é proporcional ao tamanho e forma da partícula, portanto, partículas com alto coeficiente de sedimentação (massa maior) sedimentam com rotações relativamente menores.

O isolamento das frações celulares por centrifugação fracionada só é possível se as células forem rompidas e separadas, um procedimento denominado homogeneização. Os homogenatos de tecidos animais ou vegetais contêm as frações subcelulares em suspensão, enquanto que os componentes solúveis estão em solução.

A mitocôndria

Durante uma experiência em 1898 o cientista alemão Carl Brenda pode distinguir centenas de corpos minúsculos no citoplasma, através da membrana de uma célula, os quais denominou *mitochondria*, palavra grega que significa filamentos de cartilagem. Nem ele ou outro cientista daquela época deu as mitocôndrias a devida importância, eles apenas sabiam que elas existiam e que faziam parte de uma célula. Em 1910, os cientistas estavam mais bem equipados para ver através das paredes de uma célula e examinar as funções das células vivas. Muitos cientistas suspeitavam que as mitocôndrias forneciam energia para as células. Em 1920, os cientistas tinham determinado que a mitocôndria era a usina de força que fornecia mais de 90% da energia de que a célula precisa. O verdadeiro progresso para o entendimento de suas funções ocorreu, no entanto em 1948, graças aos procedimentos desenvolvidos para isolar estas organelas na forma intacta. Por razões técnicas, muitos estudos bioquímicos foram conduzidos com mitocôndrias purificadas do fígado; cada célula hepática contém entre 1.000 a 2.000 mitocôndrias, que grosseiramente, ocupam um quinto do volume celular total.

A mitocôndria realiza a maior parte das oxidações celulares e produz a massa de ATP das células. Uma mitocôndria é definida por duas membranas concêntricas e seu principal componente de trabalho é o espaço mais interno (a matriz) e a membrana interna que o circunda. A matriz mitocondrial contém uma grande variedade de enzimas, incluindo aquelas que convertem piruvato e ácidos graxos em acetil-CoA e aquelas que oxidam Acetil-CoA em CO_2 através do ciclo do ácido cítrico. Essas reações de oxidação produzem grandes quantidades de NADH (e de FADH_2)

A cadeia respiratória utiliza a energia derivada do transporte de elétrons para bombear prótons (H^+) para fora da matriz para criar um gradiente eletroquímico transmembrana. O qual inclui tanto a contribuição de um potencial de membrana como uma diferença de pH. A grande quantidade de energia livre liberada quando o fluxo de H^+ flui de volta para a matriz (através da membrana interna) fornece a base para a produção de ATP na matriz por uma notável máquina protéica – a ATP-sintase, uma

máquina acopladora reversível entre o fluxo de prótons e a síntese ou hidrólise do ATP. O gradiente eletroquímico transmembrana também promove o transporte ativo de metabólitos selecionados através da membrana mitocondrial interna, incluindo uma eficiente troca ATP-ADP entre a mitocôndria e o citosol que mantém o estoque de ATP celular altamente carregado. A alta razão resultante de ATP em relação aos seus produtos de hidrólise torna a variação de energia livre extremamente favorável, permitindo que essa reação de hidrólise direcione um grande número de processos dependentes de energia da célula.

Principais características das mitocôndrias de tecidos animais

As mitocôndrias de tecidos animais medem de 0,7 a 1,0 micrometro e possuem diferentes formatos dependendo do tecido a partir do qual foram isoladas e também do meio de suspensão utilizado. Uma das características mais importantes é seu sistema duplo de membranas, com a membrana externa e a interna. A membrana externa é permeável a solutos de baixo peso molecular (menores que 10 kDa) devido a presença de poros formados por proteínas chamadas porinas. A membrana externa possui maior área superficial devido a numerosas cristas e além de ter baixa permeabilidade a solutos polares e íons (incluindo prótons) é também o sítio de transdução de energia.

A matriz mitocondrial possui muitas proteínas, DNA e ribossomos. Entre as proteínas estão as do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (exceto a succinato desidrogenase), da β -oxidação dos ácidos graxos e do metabolismo de alguns aminoácidos e glicose, entre outras. Os estoques de NAD^+ e NADP^+ são separados do citosol enquanto os nucleotídeos de adenina, ATP e ADP comunicam com o citosol por meio de carreados específicos.

A cadeia respiratória da mitocôndria de mamíferos é uma associação de mais de vinte carreadores de elétrons agrupados em quatro complexos enzimáticos: complexo I (NADH-UQ oxidoreductase), complexo II (succinato desidrogenase) complexo III (UQH₂-citocromo *c* oxidoreductase) e complexo IV (citocromo *c* oxidase). O complexo V é a ATP-sintase (F₀F₁ ATP sintase) e todos os complexos estão localizados na membrana interna mitocondrial. A cadeia respiratória transfere elétrons do NADH para o oxigênio, o aceptor final, e a energia da diferença de potencial redox (1,1V) é usada para criar um gradiente eletroquímico de prótons que então guia a síntese de ATP. O gradiente de prótons resulta da extrusão de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas pelos complexos I, III e IV. A dissipação do gradiente de prótons, que

retornam à matriz através complexo V, é acoplada à síntese de ATP, preservando a energia da oxidação de substratos. Em mitocôndrias do tecido adiposo marrom, um tecido presente em recém-nascidos e animais adultos hibernantes, uma proteína chamada termogenina permite que os prótons retornem à matriz mitocondrial sem passar pelo complexo V, desacoplando o fluxo de prótons da geração de ATP, de modo que a energia é dissipada na forma de calor.

A cadeia respiratória

A cadeia respiratória na membrana mitocôndria interna contém três complexos enzimáticos respiratórios principais através dos quais os elétrons fluem do NADH para o O_2 . Cada um desses complexos é capaz de bombear H^+ quando os elétrons são transportados através deles. Nestes complexos os elétrons são transferidos através de uma série de carreadores de elétrons ligados à proteína, incluindo centros de heme e de ferro-enxofre. A energia liberada quando os elétrons fluem de níveis de energia mais baixos e mais altos é utilizado para dirigir as alterações alostéricas em cada um dos complexos enzimáticos da respiração que bombeiam os prótons. Os carreadores de elétrons móveis ubiquinona e citocromo c completam a cadeia transportadora de elétrons ao mediar o transporte de elétrons entre os complexos enzimáticos. A via de fluxo dos elétrons é $NADH \rightarrow$ complexo da NADH-desidrogenase \rightarrow ubiquinona \rightarrow complexo do citocromo b- c_1 \rightarrow citocromo c \rightarrow complexo da citocromo oxidase \rightarrow oxigênio molecular (O_2).

O acoplamento do transporte de elétrons energeticamente favorável ao bombeamento de H^+ para fora da matriz cria um gradiente eletroquímico de prótons. Os complexos enzimáticos respiratórios acoplam o transporte de elétrons energeticamente favorável com o bombeamento de H^+ para fora da matriz mitocondrial. Este resultante é utilizado para sintetizar ATP por outro complexo protéico transmembrana, a ATP-sintase. Por meio do qual os prótons H^+ fluem de volta para a matriz.

Os Inibidores e os desacopladores ajudam a entender o funcionamento da mitocôndria

A sequência de eventos na cadeia de transporte de elétrons foi elucidada por meio do uso de inibidores específicos e mais tarde confirmada pela medida do potencial redox padrão dos componentes redox. A taxa de consumo de O_2 por uma suspensão de mitocôndrias é uma medida sensível da atividade da cadeia de transporte de elétrons. Os

compostos que inibem o transporte de elétrons, devido ao seu efeito no consumo de O_2 , incluem a rotenona (uma toxina vegetal usada por índios da Amazônia para envenenar peixes e usada também como inseticida), o amital (um barbitúrico), a antimicina A (um antibiótico) e o cianureto.

A adição de rotenona ou amital a uma suspensão de mitocôndrias causa bloqueio do transporte de elétrons no complexo I, a antimicina A bloqueia o complexo III e o cianureto bloqueia o transporte de elétrons no complexo IV. Cada um desses inibidores interrompe o consumo de O_2 . O consumo de oxigênio reinicia-se após a adição de substâncias cujos elétrons entram na cadeia de transporte após o bloqueio. Por exemplo, a adição de succinato a mitocôndria bloqueada pela rotenona restaura o transporte de elétrons e o consumo de O_2 . Durante este curso realizaremos experimentos dessa maneira, com inibidores do transporte de elétrons que permite revelar o ponto de entrada de elétrons a partir de vários substratos.

Mitocôndrias supridas com succinato respiram e sintetizam ATP apenas quando o ADP e o P_i forem adicionados. A adição subsequente de oligomicina, que inibe a ATP sintase, bloqueia tanto a síntese de ATP quanto a respiração. Nos últimos anos, compostos como o 2,4-dinitrofenol tem sido relacionados com o desacoplamento do transporte de elétrons e à síntese de ATP. O DNP liga prótons do espaço intermembranas e difunde-se através dela e libera os prótons na matriz, atuando como um ionóforo transportador de prótons. Assim, o transporte de elétrons segue livremente mesmo quando a síntese de ATP está inibida. Na década de 1920 o DNP foi usado como “pílula dietética”, uma pratica eficiente na indução da perda de peso, mas que apresenta efeitos colaterais fatais. Hoje em dia o uso do DNP como desacoplador se limita aos experimentos laboratoriais, como os que serão realizados durante este curso.

A mitocôndria como alvo da ação de fármacos e produtos naturais

As mitocôndrias são importantes alvos da ação de compostos químicos, como fármacos ou fitoterápicos, porque muitas destas substâncias podem provocar ruptura da membrana mitocondrial ou ainda inibir a função mitocondrial através de diferentes mecanismos. As drogas podem seqüestrar a coenzima A ou podem inibir as enzimas da β -oxidação, da transferência de elétrons ao longo da cadeia respiratória, ou a ATP-sintase. As drogas também podem destruir o DNA mitocondrial, inibir a sua replicação, diminuir os transcritos mitocondriais, ou dificultar a síntese de proteínas mitocondriais. Muitas vezes, um único medicamento tem muitos efeitos diferentes sobre a função

mitocondrial. Nos animais, por exemplo, uma deficiência grave da fosforilação oxidativa hepática compromete a formação do ATP, levando a disfunção celular ou necrose. Também pode secundariamente inibir a β -oxidação, causando assim esteatose, e pode também inibir o catabolismo de piruvato, levando a acidose láctica. Todos esses efeitos apresentam conseqüências devastadores que levam ao coma e a morte. Assim novas moléculas usadas em terapias devem sempre ser avaliadas quanto a possíveis efeitos mitocondriais. Ao longo deste curso iremos investigar os possíveis efeitos de drogas sintéticas e extratos vegetais, que estão sendo utilizados pelo nosso laboratório sobre a mitocôndria.

Medidas polarográficas de consumo de oxigênio

O estudo das funções mitocondriais ganhou grande impulso a partir do momento em que se tornou possível seguir de modo contínuo variações na concentração de oxigênio em um meio contendo mitocôndrias ou partículas mitocondriais em suspensão. O que tornou isso possível é um dispositivo polarográfico que muitas vezes recebe o nome de “eletrodo de oxigênio”. O tipo de eletrodo mais usado atualmente é o chamado Eletrodo de Clarck.

O Eletrodo de Clarck possui um fio de platina no centro (catódio) e um anel de prata (anódio) que circunda a platina, que assoma rente a superfície terminal. Revestindo o terminal há uma membrana de teflon que é fixada por um anel de borracha, sendo que, entre a membrana de teflon e o terminal coloca-se uma solução saturada de cloreto de potássio que serve como ponte eletrolítica entre os dois metais. Quando uma diferença de potencial é aplicada entre os dois metais (em geral 0,6 e 0,8 volt, polo negativo para a platina), o oxigênio é reduzido na superfície da platina, de acordo com as seguintes reações:



A soma das semirreações acima resulta em:



Dentro de certa faixa de polarização e concentração de oxigênio, o fluxo de elétrons, isto é, a corrente elétrica gerada, é proporcional a concentração de oxigênio.

Para ser utilizado, o sensor de oxigênio deve entrar em contato com a suspensão de mitocôndrias. O sistema de incubação da Universidade Estadual de Maringá é um dispositivo de acrílico com duas câmaras. Na câmara externa circula água

termostatizada (permite o controle da temperatura durante os experimentos). A câmara interna contém a suspensão mitocondrial ou qualquer outro material biológico cujo consumo de oxigênio se queira estudar. O sensor de oxigênio é fixado de forma que o lado terminal revestido pela membrana de teflon fique em contato com a suspensão. Todo o conjunto é colocado sobre agitação para facilitar a difusão de oxigênio na superfície da membrana. A câmara interna é fechada com uma tampa que possui um orifício interno que permite a adição de mitocôndrias, substratos, drogas, etc. A difusão de oxigênio por esse orifício é desprezível.

A avaliação da velocidade de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas

Quando o meio de reação contendo substrato, é adicionado, a corrente gerada é a máxima possível para a concentração de oxigênio de uma solução aquosa saturada com ar. A 37°C isto corresponde a 190 μ M; a 25°C a solubilidade aumenta para 240 μ M. Esta corrente máxima é chamada de G.

Quando mitocôndrias isoladas forem adicionadas ao meio de reação adequado (solução isosmótica tamponada) na câmara de incubação contendo substrato, haverá transformação do oxigênio em solução e será possível detectar uma queda progressiva na corrente através do polarógrafo. Inicialmente, haverá baixa velocidade de consumo de oxigênio pelo fato de que a concentração de ADP endógeno é bastante baixa, já que não há utilização de ATP nas condições de incubação. Este estado inicial pode ser chamado de velocidade inicial ou estado II.

A prova de que o ADP realmente é o fator limitante pode ser confirmado pelo fato de que a sua adição ao sistema de incubação provoca imediatamente um grande aumento na velocidade de consumo de oxigênio. Esta fase ativada da respiração é chamada de estado III e não dura muito. Na verdade a respiração permanece ativada apenas enquanto houver ADP para ser fosforilado. Desta forma, assim que todo ADP adicionado exogenamente tenha sido fosforilado, a respiração volta ao estado anterior de baixo consumo de oxigênio. Esta fase posterior pode ser chamada de estado IV, enquanto que, a capacidade de retorno a esta situação de menor consumo de oxigênio é chamada de controle respiratório (RC, *respiratory control*).

Conforme foi dito, o polarógrafo registra variações de corrente que são proporcionais à concentração de oxigênio. Estas variações de corrente podem ser avaliadas através de um registrador potenciométrico acoplado ao polarógrafo. O

registrador nos fornece um registro gráfico com a correspondente deflexão referente ao consumo de oxigênio no interior da câmara. A velocidade de consumo de oxigênio pode então ser calculada desde que a solubilidade do oxigênio a uma determinada temperatura seja conhecida, sendo que este valor, correspondente ao G, foram mencionados anteriormente.

Isolamento de mitocôndrias animais

O isolamento de frações subcelulares, a partir de tecidos animais, é uma técnica bastante difundida. As frações purificadas (mitocôndrias, peroxissomos, microsomos e vesículas de membrana plasmática), podem ser utilizadas para o estudo de atividades enzimáticas, associadas ou não, a fenômenos de transportes. Um dos tecidos mais amplamente utilizados como fonte destas frações, é o fígado. O interesse pelo isolamento de frações subcelulares a partir de fígado de rato vem crescendo muito, não só pela facilidade com que com que estas frações podem ser obtidas, comparando com outros tecidos, mas também pela importância do fígado no controle do metabolismo de carboidratos, como órgão alvo da ação drogas, hormônios e em fenômenos envolvidos em alterações fisiopatológicas como a falência geral dos órgãos.

Procedimentos para o isolamento de mitocôndrias animais

Inicialmente, passaremos a descrição do meio de isolamento de mitocôndrias:

Obs. Para todos os meios deve-se utilizar água de Milli-Q.

Solução estoque	Volume a ser adicionado (ml)	Concentração final (mM)
<i>Manitol 0,5 M</i>	100	200
Sacarose 1,0 M	19	76
Tris 1,0 M, pH 7,4	0,5	2
EGTA 0,2 M	0,25	0,2
PMSF	0,25	0,1
H₂O q.s.p 250 ml*	130	

✓ Adicionar albumina bovina livre de ácidos graxos (FFA – *free fatty acids*) a uma concentração final de 50 mg% (0,125g em 250 ml). Acertar pH para 7,4.

As mitocôndrias serão obtidas pela homogeneização do fígado no meio de isolamento acima (0 a 4°C) utilizando-se um homogeneizador Dounce.

O homogeneizado será filtrado e em seguida será centrifugado a 536 g (2.200 rpm) em centrífuga refrigerada. O sobrenadante será coletado e centrifugado a 7.080 g (8.000 rpm). O sedimento passará por dois ciclos de lavagens, por ressuspensão e recentrifugação do sedimento a 6.392 g (7.600 rpm), as mitocôndrias serão ressuspensas no mesmo meio, até concentração protéica de cerca de 40 a 50 mg/ml.

Isolamento de mitocôndrias vegetais

As mitocôndrias vegetais possuem características muito similares às mitocôndrias animais (tamanho e forma), assim como sua função celular principal é o fornecimento de energia na forma de ATP, oxidando substratos de cadeia carbônica (glicídios e lipídeos). Os complexos enzimáticos presentes na membrana interna também são semelhantes: quatro complexos (I-IV) envolvidos no transporte de elétrons e o complexo FoF1 ATP sintase (ou complexo V) que fosforila ADP em ATP.

Nas mitocôndrias vegetais existem complexos enzimáticos adicionais envolvidos na oxidação de substratos (L-malato, glicina e NAD(P)H endógeno) e um sistema NAD(P)H desidrogenase associado com a face externa da membrana interna da mitocôndria. Existe também um complexo enzimático com componentes redox alternativo aos existentes denominado oxidase alternativa, cujo papel fisiológico não está bem estabelecido, mas com evidências que esteja associada a produção de calor para realização de diversos eventos no organismo vegetal: amadurecimento e senescência dos frutos, germinação de sementes, exalação de produtos voláteis etc.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

As sementes de *Glycine max* (L.) Merrill da variedade BRS 283 foram obtidas da Embrapa soja.

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.

Isolamento de mitocôndria vegetal

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, MgCl₂ 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.

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, KH₂PO₄ 5,0mM, MgCl₂ 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 µM 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.

Procedimento para a dosagem 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 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 2%), o reativo C (tartarato de sódio a 4%) e o reativo D (reagente de Folin Ciocalteu 1 N).

No dia do experimento, misturar os reativos **a**, **b** e **c**, na seguinte ordem e volumes: 0,1 ml de **b**, 0,1 ml de **c** e 10 ml de **a** (**rigorosamente nesta ordem**).

Diluir a mitocôndria 200 vezes (995 μL de água + 5 μL da suspensão mitocondrial).

- ✓ Adicionar em tubos de ensaio (Triplicata, exceto o branco)

	Branco	Padrão	Amostra
Água	100 μL	-	-
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 foi calculada com base na absorbância encontrada no padrão de albumina 20 % de acordo com Lowry *et al.* (1951).

Determinação do consumo de oxigênio por polarografia

Para a realização destes ensaios, o seguinte meio de reação deve ser preparado:

Solução estoque	Volume a ser adicionado (ml)	Concentração final (mM)
Manitol 0,5 M	25	250
KCl 1,0 M	0,5	10
TRIS 1,0 M, pH 7,4	0,5	10

EGTA 0,2 M	0,25	0,2
Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4	2,5	5,0
H₂O q.s.p 50 ml*	21,25	

Adicionar albumina bovina (FFA) a uma concentração final de 50 mg% (0,025g em 50 ml). Acertar pH para 7,4.

Incubar alíquotas da suspensão mitocondrial (1,0 a 1,5 mg) em 2,0 ml do meio de reação (mantido em banho-maria 37°C) na câmara de incubação termostatizada acoplada ao sensor de oxigênio.

Após estabilização do registro, acrescentar um substrato oxidável:

1. 40 µl de succinato 0,5 M ou 40 µl de β-hidroxibutirato 0,5 M (concentração final = 10 mM)

Acompanhe o consumo de oxigênio através do registrador potenciométrico. Esta é a respiração inicial (ou estado II) e deve ser bastante lenta.

Adicionar o ADP:

2. 5 µl de ADP 50 mM (0,25 µmoles).

Com a adição do ADP, inicia-se o estado III da respiração, que apresenta maior velocidade de consumo de oxigênio. Quando todo ADP adicionado tiver sido consumido, a respiração volta a ficar lenta, caracterizando o estado IV da respiração mitocondrial.

Em experimentos paralelos, pode-se verificar a ação de inibidores, drogas e desacopladores.

1. Verificar a ação dos inibidores clássicos rotenona e antimicina A;
2. Verificar a ação do desacoplador 2,4-dinitrofenol
3. Verificar o efeito da oligomicina
4. Verificar os possíveis efeitos de da tibolona, um hormônio sintético e de extrato da planta *Cimicífuga racemosa* sobre o funcionamento da mitocôndria.

Avaliações da velocidade de consumo de oxigênio, controle respiratório (RC) e razão ADP/O

1. Calcular a velocidade da respiração em nmol de oxigênio consumido por minuto por miligrama de proteína ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), considere a solubilidade do oxigênio no ar como sendo igual a $190 \mu\text{M}$ a 37°C .

G (cm) ----- $190 \times 10^{-6} \text{ M}$

V (cm) ----- x M

x M ($\times 2 \times 10^{-3}$) \Rightarrow volume de incubação (2 ml)

x moles/min.mg de proteína⁻¹ (dividir pela mg de proteína adicionada)

= $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

2. Calcular o coeficiente respiratório (RC):

RC = Velocidade de consumo de O_2 no estado III

2 no estado IV

3. Calcular a razão ADP/O:

-

durante o estado III (átomo – grama)

Para isto será necessário calcular o nº de moles de ADP adicionado:

\Rightarrow nº de moles = M x V (L), sendo que foram adicionados 5×10^{-6} L de uma solução de ADP com concentração de $50 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Portanto,

\Rightarrow nº de moles = $(50 \times 10^{-3}) \times (5 \times 10^{-6})$

nº de moles = $2,5 \times 10^{-7}$

Número de átomos-grama

G (cm) ----- $190 \times 10^{-6} \text{ M}$

Distancia entre Est. III e Est. IV (cm)-----x M

x M ($x \cdot 2 \times 10^{-3}$) \Rightarrow volume de incubação (2 ml)

n° de moles = x moles ($x \cdot 2$) \Rightarrow átomos de O₂

n° de átomos-grama = Y

REFERENCIAS

ALBERTS B., LEWIS J., RAFF M.C. Biologia molecular da célula. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

VOE D., VOET J.G., PRATT C.W. Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular. 2ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

PESSAYRE D., FROMENTY B., BERSON A., ROBIN M.A., LETTÉRON P., MOREAU R., MANSOURI A. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. **Drug Metab Rev.** 2012 Feb; 44(1):3 4-87.

BRACHT A, ISHII-IWAMOTO EL, SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, CL (2003). TÉCNICA DE CENTRIFUGAÇÃO E FRACIONAMENTO CELULAR. In: Bracht A, Ishii-Iwamoto EL (ed). Métodos de Laboratório em Bioquímica, Manole Ltda: São Paulo, pp. 77-101.

MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE

Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias
Ananda Malta
Aryane Rodrigues Agostinho

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. Nas últimas décadas a obesidade tem se alastrado por diversas populações e faixas etárias em todo o mundo. A obesidade e seus problemas correlacionados são considerados atualmente 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 and 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).

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). 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).

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). 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).

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). 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 autonômica 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

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 ricas 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, Plagemann, 2000). 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 (Barella *et al.* 2012), assim como em outros modelos de obesidade (Scomparin, Gomes *et al.*, 2009). 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).

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, controle glicêmico, e avaliação da atividade simpática e parassimpática, os quais são parâmetros metabólicos classicamente alterados em indivíduos obesos.

Objetivo

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

Discutir a hipótese de que no desenvolvimento e manutenção da obesidade, o desequilíbrio do SNA é peça importante.

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)

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

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 maior 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 alimentação da prole, logo após o desmame até os 90 dias de vida, com 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

Procedimentos Cirúrgicos para Estudar o Envolvimento do SNA

- 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 MC, 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 executar um teste importante que permite avaliar o controle glicêmico em uma situação pós-prandial, denominado teste de tolerância à glicose (ivGTT)

- 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 MC, 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).

- Isolamento dos nervos superiores (Parassimpático, Vago e Simpático, Gânglio 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 traqueia. Com o uso de tesouras, pinças oftalmológicas apropriadas e auxílio de hastes de algodão, 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-Amplificator, 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-Amplificator, Insight[®], Ribeirão Preto/SP, Brazil) que a registrará graficamente.

REFERÊNCIAS

- Abizaid A & Horvath TL (2008). Brain circuits regulating energy homeostasis. *Regul Pept* **149**, 3-10.
- Ahren B (1999). Regulation of insulin secretion by nerves and neuropeptides. *Ann Acad Med Singapore* **28**, 99-104.
- Ahren B (2000). Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia* **43**, 393-410.
- 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.
- Ashcroft FM & Ashcroft SJH (1992). *Insulin : molecular biology to pathology*. Oxford University Press, Oxford.
- Badman MK & Flier JS (2007). The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterology* **132**, 2103-2115.
- Balbo SL, Bonfleur ML, Carneiro EM, Amaral ME, Filiputti E & Mathias PC (2002). Parasympathetic activity changes insulin response to glucose and neurotransmitters. *Diabetes Metab* **28**, 3S13-17; discussion 13S108-112.
- Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, Bonfleur ML, Gravena C, Brito Mdo N, Andreazzi AE, Mathias PC & Torrezan R (2007). Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine* **31**, 142-148.
- Balbo SL, Mathias PC, Bonfleur ML, Alves HF, Siroti FJ, Monteiro OG, Ribeiro FB & Souza AC (2000). Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* **108**, 291-296.
- Batista Filho M & Rissin A (2003). [Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends]. *Cad Saude Publica* **19 Suppl 1**, S181-191.
- Berthoud HR & Morrison C (2008). The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol* **59**, 55-92.
- Bray GA (1991). Obesity, a disorder of nutrient partitioning: the MONA LISA hypothesis. *J Nutr* **121**, 1146-1162.
- Bray GA & York DA (1979). Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev* **59**, 719-809.
- Bray GA & York DA (1998). The MONA LISA hypothesis in the time of leptin. *Recent Prog Horm Res* **53**, 95-117.
- Breier BH, Vickers MH, Ikenasio BA, Chan KY & Wong WP (2001). Fetal programming of appetite and obesity. *Mol Cell Endocrinol* **185**, 73-79
- Coupe B, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Lefevre F, Mairesse J, Dickes-Coopman A, Silhol M, Tapia-Arancibia L, Lesage J & Vieau D (2009). 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* **21**, 40-48.

- 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.
- de Moura EG & Passos MC (2005). Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep* **25**, 251-269.
- Fehm HL, Kern W & Peters A (2006). The selfish brain: competition for energy resources. *Prog Brain Res* **153**, 129-140.
- Gao Q & Horvath TL (2008). Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Lett* **582**, 132-141.
- Gerozissis K (2008). Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *Eur J Pharmacol* **585**, 38-49.
- Gilon P & Henquin JC (2001). Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* **22**, 565-604.
- Guyton AC & Hall JE (2006). *Textbook of medical physiology*. Elsevier Saunders ; Oxford : Elsevier Science [distributor], Edinburgh.
- Hallal PC, Wells JC, Bertoldi AD, Gazalle FK, Silva MC, Domingues MR, Carret ML, Araujo CL & Gigante DP (2005). A shift in the epidemiology of low body mass index in Brazilian adults. *Eur J Clin Nutr* **59**, 1002-1006.
- Hill JO & Peters JC (1998). Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* **280**, 1371-1374.
- Howard BV (2002). Dietary fat as a risk factor for type 2 diabetes. *Lipids and Insulin Resistance: The Role of Fatty Acid Metabolism and Fuel Partitioning* **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.
- Obici S (2009). Minireview: Molecular targets for obesity therapy in the brain. *Endocrinology* **150**, 2512-2517.
- 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.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W & Dorner G (2000). Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr* **130**, 2582-2589.
- Plagemann A, Heidrich I, Gotz F, Rohde W & Dorner G (1992). Lifelong enhanced diabetes susceptibility and obesity after temporary intrahypothalamic hyperinsulinism during brain organization. *Exp Clin Endocrinol* **99**, 91-95.
- 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.
- Rodrigues AL, De Souza EP, Da Silva SV, Rodrigues DS, Nascimento AB, Barja-Fidalgo C & De Freitas MS (2007). Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol* **195**, 485-494.
- Sawaya AL, Martins PA, Grillo LP & Florencio TT (2004). Long-term effects of early malnutrition on body weight regulation. *Nutr Rev* **62**, S127-133.
- Scomparin DX, Gomes RM, Grassioli S, Rinaldi W, Martins AG, de Oliveira JC, Gravena C & de Freitas Mathias PC (2009). Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. *Endocrine*.
- Siqueira KS, Appolinario JC & Sichieri R (2004). Overweight, obesity, and binge eating in a non-clinical sample of five Brazilian cities. *Obes Res* **12**, 1921-1924.
- 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.
- Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ & Liu XH (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* **74**, 683-701.
- Yamaguchi N (1992). 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* **70**, 167-206.
- Yoshimatsu H, Egawa M & Bray GA (1993). Sympathetic nerve activity after discrete hypothalamic injections of L-glutamate. *Brain Res* **601**, 121-128.

INFLUÊNCIA DA SÍNDROME METABÓLICA EM ILHOTAS PANCREÁTICAS

Dr. Paulo César de Freitas Mathias
Claudinéia Conationi da Silva Franco
Rosiane Aparecida Miranda

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o mundo sofreu intensas modificações em suas condições de vida, nutrição e saúde. Junto às principais mudanças destaca-se a ascensão da obesidade. De acordo com a Organização mundial da saúde, estima-se que a cada dez adultos um seja obeso (Organização Mundial da Saúde, 2004).

A obesidade é considerada uma doença multifatorial decorrente de diversos fatores podendo ser definida, de forma simplificada, como uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, sendo consequência de balanço energético positivo e que acarreta repercussões à saúde com perda importante não só na qualidade como na quantidade de vida (Mendonca and dos Anjos, 2004).

Várias teorias existem sobre as origens da obesidade, incluindo o aumento do consumo de energia densa de alimentos e estilo de vida sedentário. Evidências recentes indicam que as experiências alteradas nutricionalmente durante o desenvolvimento precoce (fetal e de amamentação) desempenham um papel importante na etiologia da obesidade por indivíduos predispostos ao seu desenvolvimento e mais tarde da síndrome metabólica (McMillen and Robinson, 2005; Nathanielsz and Padmanabhan, 2006; Plagemann et al., 2006).

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. O excesso de gordura corporal está associada à doença cardiovascular (Mykkanen et al., 1992; Stern, 1995), hipertensão arterial (Ryan et al., 1994), dislipidemias (Hardman, 1999), resistência à insulina, diabetes mellitus tipo II (Weiss and Caprio, 2005), distúrbios respiratórios, alterações articulares, aumento da incidência de câncer no endométrio, mama, esôfago, rins, fígado, vesícula biliar e pâncreas (Osorio-Costa et al., 2009).

Uma das doenças mais prevalentes no mundo relacionada à obesidade é o diabetes mellitus, doença crônica não transmissível (DCNT), causada por disfunção nas células β pancreáticas, sendo caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas, resultantes das alterações na produção e secreção e/ou no mecanismo de ação da insulina (Gavin et al., 1997).

Em mamíferos adultos, as células β -pancreáticas das ilhotas de Langerhans são a única fonte de produção de insulina. Essas células não só produzem insulina, mas secretam esse hormônio em quantidades apropriadas para manter os níveis de glicose plasmática dentro dos estreitos limites fisiológicos.

Diferentes sinais como fatores humorais (hormônios, como o glucagon, vitaminas, nutrientes, íons etc.), estimulação nervosa (acetilcolina) e fatores de comunicação intercelular entre ilhotas, garantem a apropriada função das células β , que mantêm os níveis basais de insulina, e sua principal estimulação é dependente do nível de glicose (Leibiger et al., 2002).

A insulina exerce diversas ações biológicas, as quais incluem regulação de glicose, síntese de lipídeos e proteínas e a transcrição gênica (Rosen, 1987). Com a falta desse hormônio, observa-se um quadro de hiperglicemia, situação que induz uma série de patologias em diferentes tecidos; entre os mais importantes, têm-se as células vasculares e neuronais, conforme observado em modelos animais e em pacientes diabéticos (Koya and King, 1998)

Diversos modelos de obesidade experimental são propostos a fim de se compreender os processos que levam ao desenvolvimento da síndrome metabólica, sendo o modelo animal mais comumente usado, ainda que não considerado exatamente igual ao modelo de obesidade humana.

Os diferentes modelos experimentais de obesidade podem ser classificados em: a) modelos genéticos: animais onde houve uma mutação gênica, animais transgênicos ou naqueles onde se produziu *knock-out* de um ou mais genes; b) aqueles nos quais a resistência à insulina é secundária a uma condição patológica ou, c) aqueles nos quais a resistência à insulina é induzida através da administração de drogas ou dietas.

Os modelos experimentais de obesidade mais comumente utilizados em nosso laboratório incluem: o tratamento neonatal com glutamato-monossódico (MSG), redução de ninhada e dieta hiperlipídica.

Com base no exposto, o mini-curso propõe estudar a influência da síndrome metabólica nas ilhotas pancreáticas, avaliando os níveis de secreção de insulina *in vitro*

estimulada por diferentes concentrações de glicose nestes modelos experimentais, além da demonstração de técnicas moleculares para avaliação da expressão proteica nesse tecido.

Objetivos

Estudar a influência da síndrome metabólica em ilhotas pancreática, avaliando os níveis de secreção de insulina *in vitro* estimulada por diferentes concentrações de glicose em modelos experimentais.

Demonstrar técnicas moleculares para avaliação da expressão proteica em ilhotas pancreáticas de ratos Wistar.

Materiais e Métodos

Animais

Serão utilizados ratos Wistar, de 90 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção, vinculado ao Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá. Os protocolos experimentais serão desenvolvidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá.

Isolamento das Ilhotas de Langerhans

Ilhotas pancreáticas serão isoladas, adotando-se a metodologia previamente descrita (Fritschy et al., 1992). Um grupo de ratos (90 dias) será sacrificado por decapitação e logo em seguida laparotomizado para exposição do ducto biliar comum, sendo este dissecado próximo ao pedículo hepático por onde se introduzirá uma cânula de polietileno. Após a canulação do ducto biliar comum e a oclusão da sua extremidade distal próxima a entrada do duodeno, serão injetados no interior do pâncreas 8 mL de uma solução contendo colagenase tipo XI, 0.1%; soro albumina bovina (SAB), 5% e HEPES [N-(2-hydroxyethyl-piperazine)-N'-(2-ethanesulphonic acid)], 0.6%, (Sigma-Aldrich[®], St Louis/MO, USA) adicionados em solução Hanks [(mmol/L): NaCl, 136,9; KCl, 5,4; MgSO₄·7H₂O, 0,81; Na₂HPO₄, 0,34; KH₂PO₄, 0,44; CaCl₂·2H₂O, 1,26; NaHCO₃, 4,16; glicose, 0,06; SAB, 15 e (O₂, 95% + CO₂, 5%)/10 min, pH 7,4]. Após inflados, os pâncreas serão retirados e colocados em becker de 250 mL e incubados por

17-18 min a 37 °C sob constante agitação em banho-maria (Dubnoff, TE – 053, Tecnal[®], Piracicaba/SP, Brasil). Após a incubação os pâncreas serão retirados, lavados em solução Hanks e postos para decantar por um intervalo de 5-10 min; em seguida o sobrenadante será sugado e o procedimento repetido por mais duas a três vezes. As ilhotas serão visualizadas e coletadas com o auxílio de uma lupa estereoscópica (Estereomicroscópio binocular, SQZ-DS4-BI-35, Tecnival[®], Brasil).

Secreção de insulina em ilhotas pancreáticas incubadas

Em placas para cultura de células, grupos de 4 ilhotas/poço serão previamente incubados por 1 h a 37 °C em 1 mL de solução Krebs-Ringer [(mmol/L): NaCl, 115; NaHCO₃, 24; KCl, 1,6; MgCl₆H₂O, 1; CaCl₂H₂O, 1; SAB, 15; e pH 7,4] contendo glicose a 5,6 mmol/L, oxigenada (O₂, 95% + CO₂, 5%). Em seguida o sobrenadante será aspirado dos poços e colocado 1 mL de uma nova solução Krebs-Ringer contendo uma das diferentes concentrações de glicose [(mmol/L): 5,6; 8,3; 11,1; 16,7 ou 20,0, 24,0], e então novamente incubadas por 1 h a 37 °C oxigenada (O₂, 95% + CO₂, 5%). Ao final da incubação o sobrenadante será coletado dos poços e congelado a -20 °C em freezer (Freezer F250, Eletrolux[®], Brasil) para a posterior dosagem de insulina pelo método de radioimunoensaio (RIA).

Quantificação da expressão proteica

Após coletadas, as amostras teciduais serão congeladas a -80 °C (Sanyo Vip[®], MDF-U36V, Moriguchi/Osaka, Japan) para posterior quantificação de proteínas. Para a quantificação proteica as amostras serão descongeladas e sonicadas (2 vezes, 10 s; Sonic Dismembrator Model 100, Fischer Scientific, Waltham/MA, USA) em 300 µL de tampão de lise [(mmol/L): HEPES, 50; MgCl₂, 1; EDTA, 10 e Triton X, 1%] contendo 5 µL/ mL de coquetel de inibidores de proteases, Complete EDTA free (Roche[®]) e centrifugadas (10,000 rpm, 4 °C/5 min). Aproximadamente 300 µL do sobrenadante serão coletados, e o conteúdo total de proteínas será determinado pelo método estabelecido no kit BCA[™] (Thermo Scientific[®], Rockford/IL, USA) e lido em leitor apropriado para microplacas (Multi-Mode Microplate Reader, FlexStation[®] 3 Benchtop, Molecular Devices, Sunnyvale/CA, USA).

As amostras serão tratadas com tampão de Laemmli [glicerol, 20%; β-mercaptoetanol, 10%; 10% SDS (dodessil sulfato de sódio), 40%; Tris, 0,5 mol/L e pH 6,8, 0,5%; água deionizada e azul de bromofenol] (Laemmli, 1970) a 100°C/3 min.

Quarenta microgramas (40 µg) de extrato total de proteínas de cada tecido será separado em gel de poliacrilamida SDS a 10% a 90 V/120 min (Mini-Protein Bio-Rad®). Em seguida as proteínas serão transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose através do (Trans-Blot® SD Semi-Dry 15-Minutes Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad®) e bloqueadas com 5% de leite desnatado em (Tris-HCl, 1 mol/L; NaCl, 5 mol/L e Tween 20, 0.05%) a temperatura ambiente por 1,5 h sob agitação. Após o bloqueio as membranas serão incubadas “*overnight*” a 4 °C sob agitação com anticorpo primário específico para a proteína de interesse. Em seguida serão lavadas por três vezes consecutivas em TBS-Tween e incubadas por 1,5 h com anticorpo secundário da mesma espécie reativa do anticorpo primário utilizado anteriormente, diluído em (Tris-HCl, 20 mmol/L; NaCl, 137 mmol/L e Tween 20, 0.05%).

As proteínas imunorreativas serão visualizadas com o uso de kit ECL (GE Healthcare, Buckingham/Shire, UK) escaneadas através de leitor apropriado (Amersham Storm™ 860 Imaging System, Gene Tool, Milpita/CA, USA). As bandas serão quantificadas por densitometria, usando o programa Image J 1.4 Software (Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda/MA, USA).

REFERÊNCIAS

Fritschy, W.M., van Suylichem, P.T., Wolters, G.H., and van Schilfgaarde, R. (1992). Comparison of top and bottom loading of a dextran gradient for rat pancreatic islet purification. *Diabetes Res* 19, 91-95.

Gavin, J.R., Alberti, K.G.M.M., Davidson, M.B., DeFronzo, R.A., Drash, A., Gabbe, S.G., Genuth, S., Harris, M.I., Kahn, R., Keen, H., *et al.* (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20, 1183-1197.

Hardman, A.E. (1999). Physical activity, obesity and blood lipids. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 *Suppl* 3, S64-71.

Koya, D., and King, G.L. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47, 859-866.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Leibiger, I.B., Leibiger, B., and Berggren, P.O. (2002). Insulin feedback action on pancreatic beta-cell function. *FEBS Lett* 532, 1-6.

McMillen, I.C., and Robinson, J.S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85, 571-633.

Mendonca, C.P., and dos Anjos, L.A. (2004). [Dietary and physical activity factors as determinants of the increase in overweight/obesity in Brazil]. *Cad Saude Publica* 20, 698-709.

Mykkanen, L., Laakso, M., and Pyorala, K. (1992). Association of Obesity and Distribution of Obesity with Glucose-Tolerance and Cardiovascular Risk-Factors in the Elderly. *Int J Obesity* 16, 695-704.

Nathanielsz, P.W., and Padmanabhan, V. (2006). Developmental origin of health and disease. *J Physiol* 572, 3-4.

Osorio-Costa, F., Rocha, G.Z., Dias, M.M., and Carnevalheira, J.B. (2009). Epidemiological and molecular mechanisms aspects linking obesity and cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53, 213-226.

Plagemann, A., Davidowa, H., Harder, T., and Dudenhausen, J.W. (2006). Developmental programming of the hypothalamus: a matter of insulin. A comment on: Horvath, T. L., Bruning, J. C.: Developmental programming of the hypothalamus: a matter of fat. *Nat. Med.* (2006) 12: 52-53. *Neuro Endocrinol Lett* 27, 70-72.

Rosen, O.M. (1987). After insulin binds. *Science* 237, 1452-1458.

Ryan, A.S., Roche, A.F., Wellens, R., and Guo, S. (1994). Relationship of Blood-Pressure to Fatness and Fat Patterning in Mexican-American Adults from the Hispanic

Health and Nutrition Examination Survey (Hhanes, 1982-1984). *Collegium Antropol* 18, 89-99.

Stern, M. (1995). Epidemiology of Obesity and Its Link to Heart-Disease. *Metabolism-Clinical and Experimental* 44, 1-3.

Weiss, R., and Caprio, S. (2005). The metabolic consequences of childhood obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19, 405-419.

ESTUDO DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS PROVOCADAS POR ETANOL E OUTRAS DROGAS

Dr. Adelar Bracht
Dra. Clairce Luzia Salgueiro
Dra Emy Luiza Ishii Iwamoto
Dra Jorgete Constantin
Dr. Jurandir Fernando Comar
Dra Nair Seiko Yamamoto
Anacharis Babeto de Sá Nakanishi
Fabiana Rodrigues Silva Gasparin
Monique Cristine de Oliveira
Rodrigo Polimeni Constantin
Vanessa Rodrigues Vilela

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 íntegro(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 termostatazada 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.

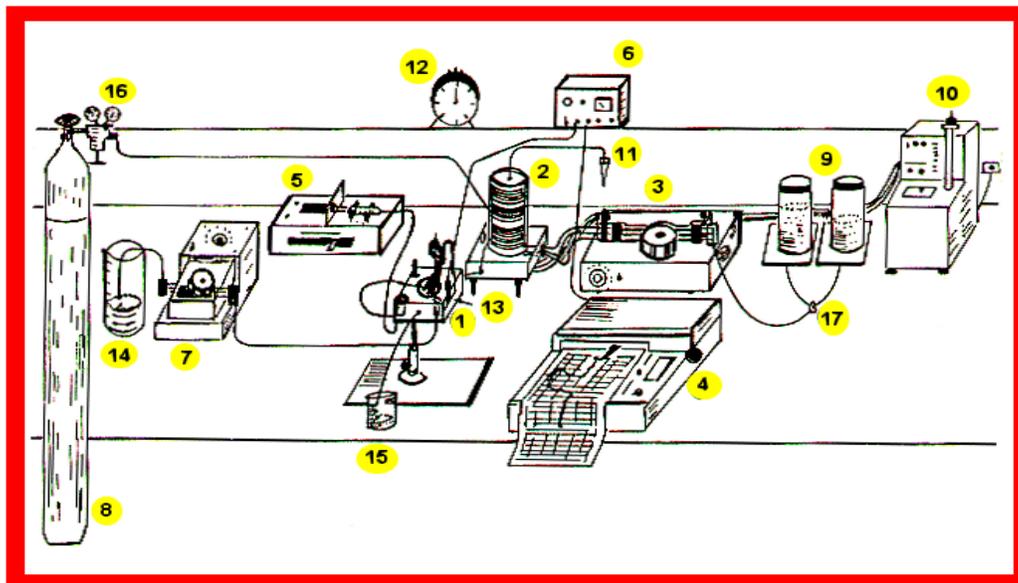


Figura 1.12. Representação semi-esquemática da aparelhagem de perfusão do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade de Maringá. Os componentes estão numerados: (1) câmara do fígado mostrando a posição do fígado isolado e em perfusão; (2) oxigenador de membrana com aquecimento e troca simultânea 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 termostático 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.

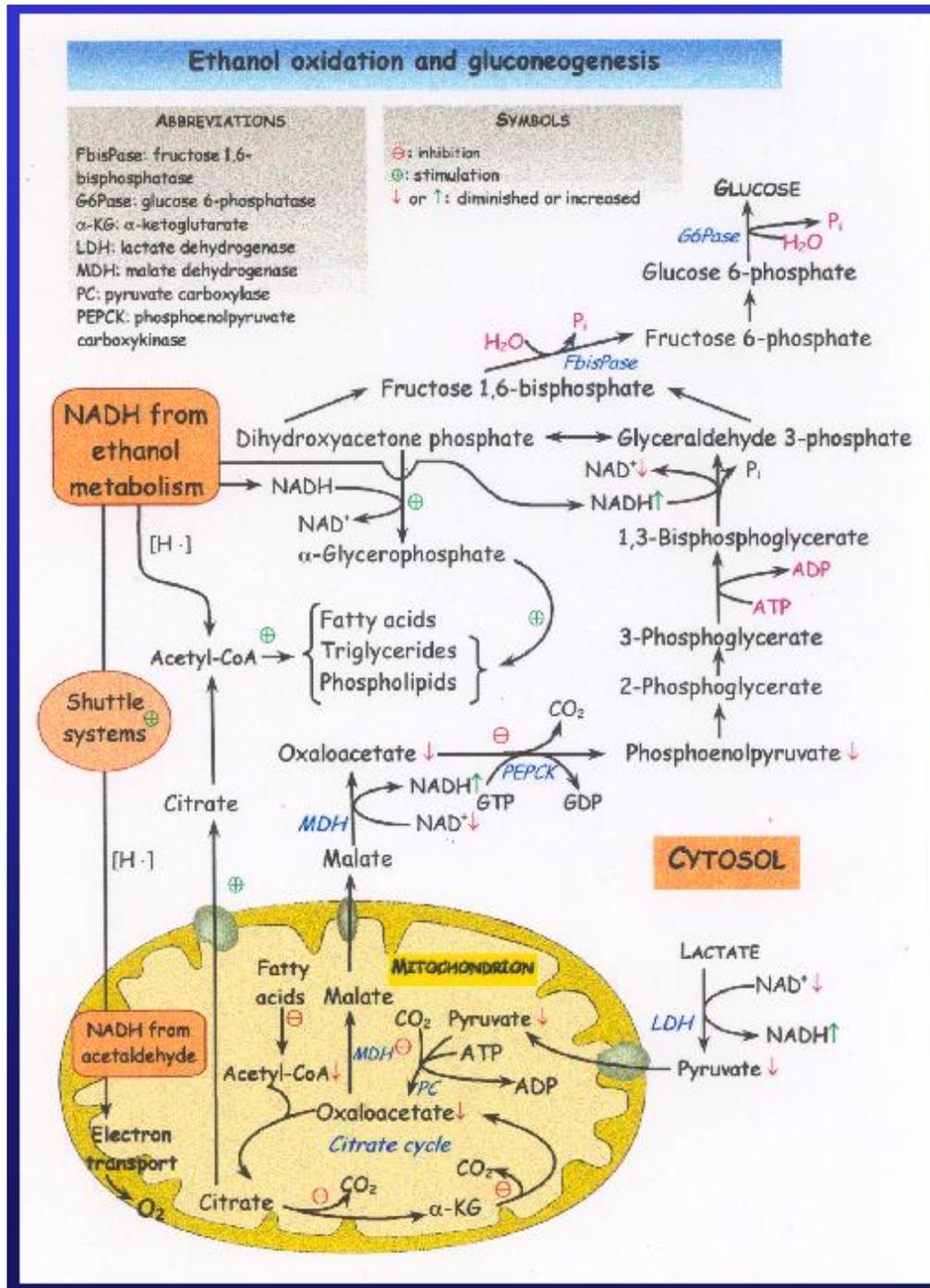
Para colocar o fígado na plataforma, no entanto, deve-se removê-lo cortando por baixo do diafragma até uma completa separação do órgão do restante do animal. Convém fazer isto com uma tesoura de pontas arredondadas, prestando muita atenção para não seccionar o fígado. Um auxiliar deverá levantar o rato 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 ($\bullet\text{O}_2^-$), 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 HO• é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser seqüestrado *in vivo*. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 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 (•O₂⁻) 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), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR), além das moléculas glutationa 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).

OBJETIVOS

Conhecer metodologias que permitem o estudo das 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

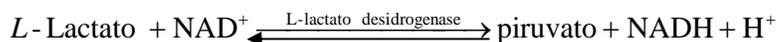
1) **Mistura reagente para a dosagem enzimática de lactato:** 35 ml de tampão glicina 0,1 M/hidrazina 0,4 M a pH 9,0; 0,035 g de NAD⁺; 40 µl da suspensão de lactato desidrogenase.

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

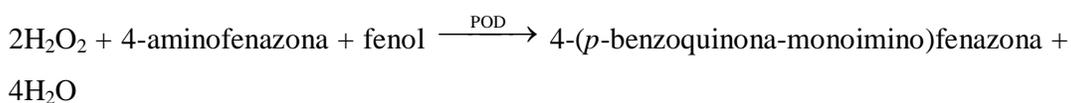
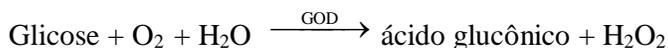
Método enzimático segundo Bergemeyer (1974). A reação catalisada pela lactato desidrogenase (LDH):



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:



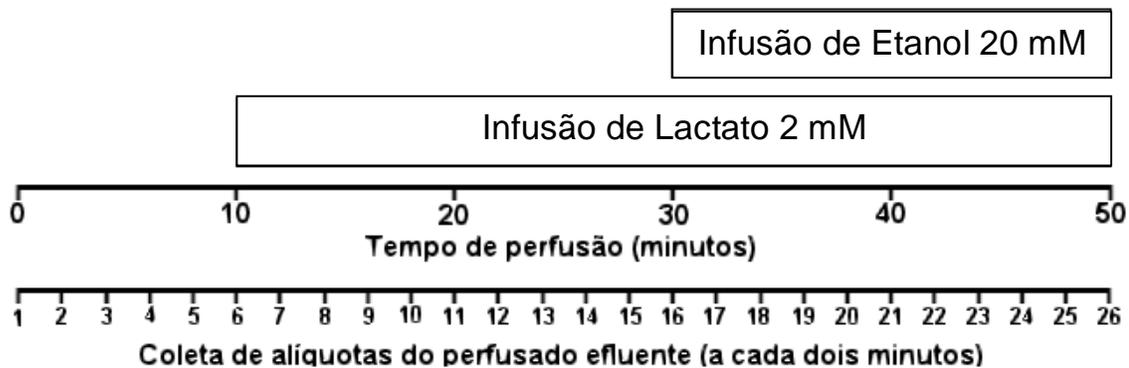
A intensidade da cor formada é diretamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra.

4. Protocolo experimental

1) Anestesiari 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 ($O_2:CO_2 \therefore 95:5$), a concentração do oxigênio aumenta e, depois de algum tempo, estabiliza-se em torno de $860 \mu M$; 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., $190 \mu M \times 4,52 \approx 860 \mu M$); 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 $860 \mu M$ 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 $190 \mu M$ 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:

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

7. Cálculo dos fluxos metabólicos

Os fluxos metabólicos serão expressos em μmol por minuto por grama de fígado ($\mu mol \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$). 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 μM) 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; assinale 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 μ L de água + 10 μ L da amostra do homogenato).

- ✓ Adicionar em tubos de ensaio (Triplicata)

Dosagem de proteínas			
	Branco	Padrão	Amostra
Água	100 μ L	-	-
Padrão	-	100 μ L	-
Amostra diluída	-	-	100 μ L
Mistura reativa	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L
AGITAR CADA TUBO E AGUARDAR 10 MIN. (AMBIENTE)			
Folin 1N	100 μ L	100 μ L	100 μ L
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
 - 25 μ L de homogenato (H1)
 - 1 mL de meio de precipitação
 - 500 μ L de TCA 15%
 - 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
 - 50µL de homogenato (H1)
 - 1mL de meio de precipitação da técnica do GSH
 - 500µL de TCA 15%
 - CENTRIFUGAR POR 3 MINUTOS – 9800rpm
- ✓ Adicionar em tubos de ensaio grandes (MIX)

- 200 µL de NEM
- 500 µL de sobrenadante

Incubar por 30 minutos em temperatura ambiente e adicionar:

- 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
 - 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.

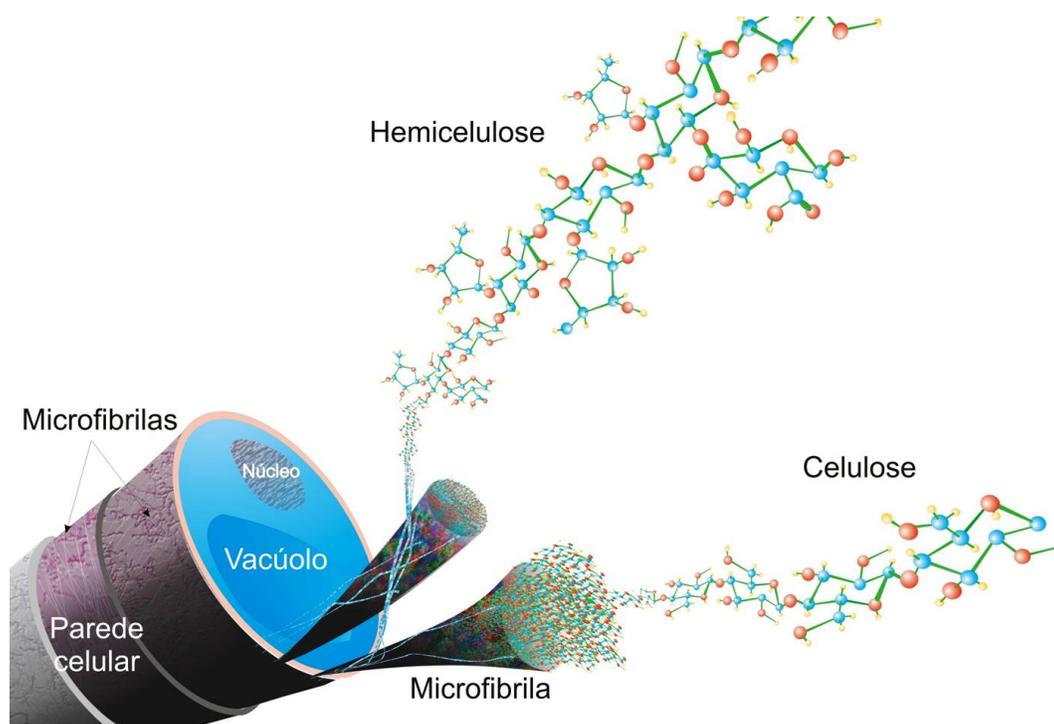
REITER, R.J. (1995). Oxidative process and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *The FASEB Journal*, 9:526-533.

AGRO-DESIGN: MODIFICANDO A BIOMASSA PARA APLICAÇÕES INDUSTRIAIS

Oswaldo Ferrarese-Filho
Maria de Lourdes Lúcio Ferrarese
Wanderley Dantas dos Santos
Aline Finger Teixeira
Ana Paula Ferro
Angela Valderrama Parizotto
Graciene de Souza Bido

1. INTRODUÇÃO

Após o surgimento da parede celular secundária as plantas desenvolveram a rigidez e hidrofobicidade necessárias para a condução da água, necessária para viver em ambientes terrestres secos (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 forem consideradas outras lavouras 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).

A desmontagem bioquímica – controlada – da parede celular tem sido proposto como alternativa para tornar viável o uso dos polissacarídeos como fonte de açúcares fermentáveis. 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 estrutura da lignina e da rede de polímeros que constitui a parede celular. Além disso, o conhecimento das propriedades físicas e biológicas da parede celular em diferentes tecidos e órgãos bem como das suas vias de síntese pode ser usado para modificar as características da parede para uso industrial ou alimentar.

Depois da celulose, a lignina é o polímero mais abundante das paredes celulares (Polle et al., 1994). Ela reduz a digestibilidade dos polissacarídeos de plantas forrageiras, afeta a qualidade do papel e reduz a produção do bioetanol de segunda geração. Os principais programas de pesquisa e desenvolvimento envolvendo a lignina buscam reduzir 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 deriva dos métodos de quantificação total e as estimativas dos componentes monoméricos (Micic et al., 2002).

A lignina é formada por uma mistura racêmica de heteropolímeros aromáticos, composto principalmente, de três hidroxicinamil álcoois (*p*-cumaril, coniferil e sinapil) que diferem 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.

Compostos fenólicos como os ácidos *p*-cumárico e ferúlico são componentes da lignina e estão ligados à parede celular, juntamente com dímeros do ácido ferúlico (Barrière et al., 2009). Os resíduos de ácido ferúlico parecem funcionar como sítios de nucleação para a polimerização de lignina (Ishii, 1997), fornecendo pontos de crescimento para o polímero e ligações na parede celular (Jacquet et al., 1995). O ácido ferúlico pode ser esterificado com polissacarídeos da parede celular, principalmente a glicuronoarabinoxilanos, enrijecendo-a e restringindo o crescimento celular (Sánchez et al., 1996; Lam et al., 2001).

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

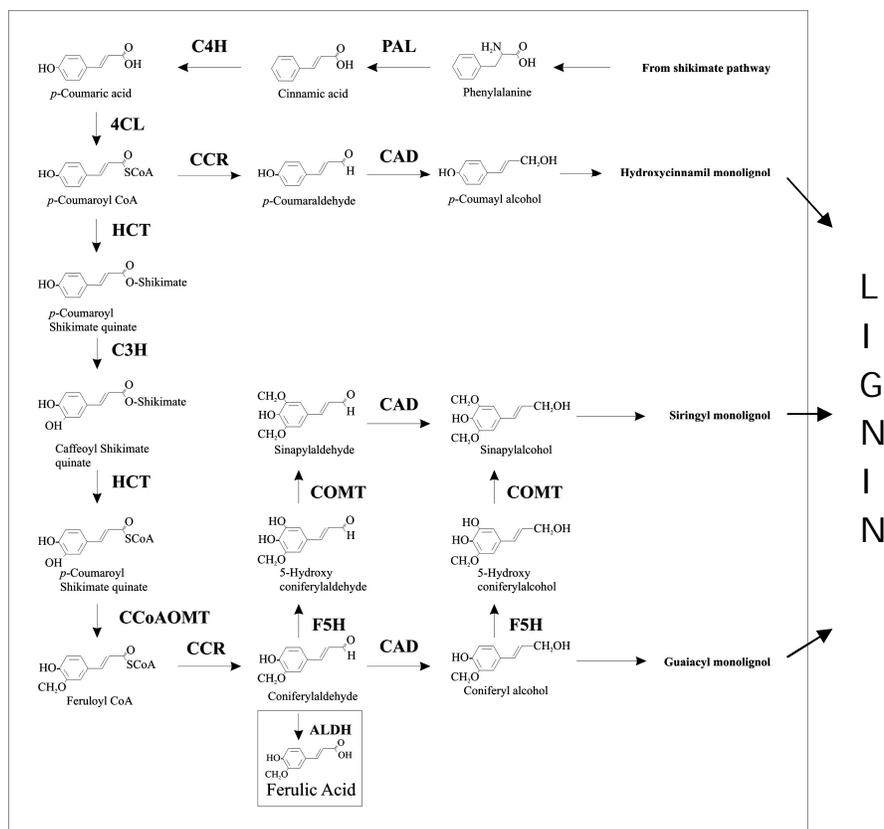


Fig. 1. Via dos fenilpropenóides e biossíntese da lignina simplificada destacando a produção de ácido ferúlico (dos Santos *et al.*, 2008). (**PAL**, fenilalanina amônia liase, **C4H**, cinamato 4-hidroxilase, **4-CL**, 4-cumarato:CoA ligase, **HCT**, hidroxicinamoil-CoA chiquimato/quinato transferase, **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, **ALDH**, Aldeído desidrogenase).

A primeira reação da via dos fenilpropenóides é catalisada pela fenilalanina amônia liase (PAL), que converte L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico. 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 fenilpropenóides 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).

A coniferaldeído desidrogenase (CALDH) é uma proteína que exerce atividade catalítica oxidando irreversivelmente moléculas de coniferaldeído, reduzindo NAD(P)+ e formando ácido ferúlico.

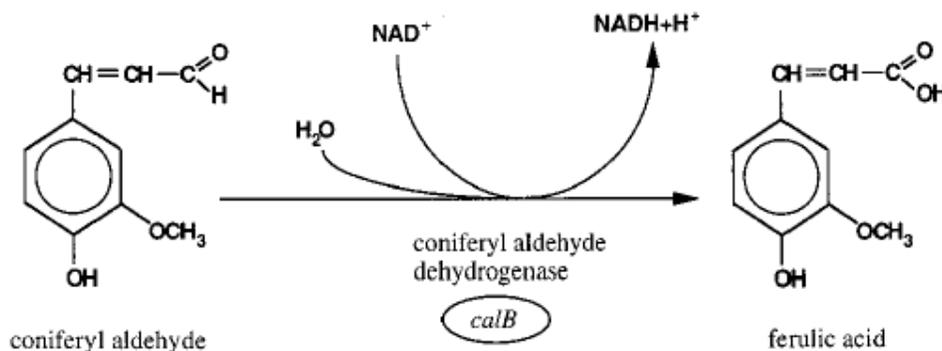


Fig. 2. CALDH, codificada por *calB*, catalisa a oxidação NAD⁺-dependente do coniferaldeído a ácido ferúlico (Achterholt *et al.* 1998).

Considerando que o ácido ferúlico aumenta a recalcitrância da parede celular, algumas técnicas estão sendo pesquisadas no intuito de diminuir sua produção. Ferramentas de bioinformática vêm sendo aplicadas neste sentido para construção, simulação e análise de estruturas 3D na prospecção de inibidores enzimáticos.

A modelagem por homologia comparativa é usualmente o método de escolha quando existe uma clara relação de homologia entre a seqüência da proteína alvo e pelo menos uma estrutura 3D conhecida. Além disso, o conhecimento detalhado da estrutura da proteína-alvo torna-se fundamental, bem como, a via metabólica na qual ela participa.

Uma metodologia que se mostra eficiente para identificação de novos inibidores é a abordagem computacional de simulação do encaixe de um ligante no sítio ativo de uma enzima. Esta metodologia é chamada de docagem molecular (Shoichet, 2004).

2. OBJETIVOS

- Compreender a arquitetura e as propriedades da parede celular vegetal, bem como sua complexidade e diversidade;
- Relacionar a via dos fenilpropenoides com os processos bioenergéticos;

- c) Identificar a importância da estrutura tridimensional da enzima-alvo e prospecção de possíveis inibidores utilizando ferramentas da bioinformática;
- d) Determinar o crescimento (comprimento e biomassa fresca e seca) de plântulas tratadas ou não com ácido ferúlico;
- e) Quantificar o conteúdo de lignina total e sua composição monomérica, determinando a proporção dos principais monômeros (*p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil);
- f) Verificar a atividade enzimática da CALDH e relacionar a produção do ácido ferúlico com a recalcitrância da parede celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo e preparação das plântulas

Sementes de milho (*Zea mays*) serão desinfetadas 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, contendo ou não ácido ferúlico 1 mM. 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.

3.2. Crescimento de plântulas de milho

Para avaliação do crescimento das raízes, estas foram medidas no início e final de cada experimento, com auxílio de régua milimetrada. As diferenças entre os comprimentos iniciais e finais serão determinadas e os resultados expressos em centímetros. As raízes serão excisadas e, imediatamente, determinada a biomassa fresca, utilizando-se balança analítica. Os resultados serão expressos em gramas. Em seguida as raízes serão acondicionadas em estufa, à temperatura de 60°C, até a obtenção de peso constante, para obtenção da biomassa seca.

3.3. Preparação da parede celular

Tecidos secos (0,3 g), serão homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 (7 ml) e transferidos para um tubo de centrifuga (Ferrarese et al., 2002). O precipitado será centrifugado (1.400×g, 6 min), lavado e centrifugado sucessivamente como segue: mais 2 vezes com tampão fosfato 50 mM pH 7,0 (7 ml); 3 vezes com Triton[®] X-100 1% (v/v) em tampão pH 7,0 (7 ml); 2 vezes com NaCl 1 M 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 (60°C, 24 h) e a massa definida como a fração da parede celular livre de proteínas.

3.4. 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 centrifuga 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.

3.5. 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.

3.6. Determinação da atividade enzimática da CALDH (coniferaldeído desidrogenase)

Após o período de incubação (24 h), raízes frescas (2 g) serão maceradas em 3,0 mL de tampão Hepes-HCL 50 mM, pH 8,0, contendo DTT 5 mM, EDTA 1 mM e glicerol 10% (v/v). A seguir, o extrato será centrifugado (2.200×g, 30 min, 4° C), o sobrenadante coletado e a proteína será precipitada pela adição de sulfato de amônio a 70% de saturação. A suspensão será novamente centrifugada (2.200×g, 15 min, 4° C) e o pellet será homogeneizado com meio de extração composto por tampão Hepes-HCL 50 mM, pH 8,0, contendo DTT 5 mM, EDTA 1 mM e 10% de glicerol (v/v). As amostras serão usadas como preparação enzimática. Os ensaios serão conduzidos em meio de reação Hepes-HCL 50 mM, pH 8,0, DTT 5 mM, NAD⁺ 1 mM e 100 µL de extrato enzimático. A reação será iniciada com a adição de coniferaldeído 30 µM, será conduzida a 40 °C num volume total de 1 mL e interrompida após 10 min com 60 µL de HCL 3 M (Nair *et al.*, 2004). As amostras serão centrifugadas (16.000×g, 2 min), 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-20AT, um auto-injetor SIL-20A, um detector SPD-M20A (Photodiode Array Detector-PDA), um módulo de comunicação CBM-20A e desgaseificador DGU-20A5. Uma coluna de fase-reversa Shimpack® CLC-ODS (M) (150 × 4.6 mm, 5 µm) com uma pré-coluna equivalente (10 × 4.6 mm) e um forno de coluna CTO-20A

mantido a 30° C. A coleta de dados e a integração serão realizados com o software LCSolution (Shimadzu[®], Tóquio, Japão). A fase móvel usada será metanol/ácido acético 4% (30/70, v/v), com fluxo de 1,0 ml min⁻¹, para uma corrida isocrática de 20 min. O ferulato produzido pela CALDH será identificado a 330 nm por comparação com os valores do tempo de retenção do padrão. A atividade da CALDH será expressa como $\mu\text{mol ferulato h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

REFERÊNCIAS

ACHTERHOLT S., PRIEFERT H., STEINBÜCHEL A. 1998. Purification and Characterization of the Coniferyl Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. Strain HR199 and Molecular Characterization of the Gene. *J Bacteriology*. 180:4387-4391.

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.

BARRIÈRE Y., MÉCHIN V., LAFARGUETTE F., MANICACCI D., GUILLON F., WANG H., LAURESSERGUES D., PICHON M., BOSIO M., TATOUT C. 2009. Toward the discovery of maize cell wall genes involved in silage quality and capacity to biofuel production. *Maydica*. 54: 161-198.

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.

Dos SANTOS W.D., FERRARESE M.L.L., NAKAMURA C.V., MOURÃO K.S.M., MANGOLIM C.A., FERRARESE-FILHO O. Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *J Chem Ecol*. 34:1230-1241, 2008.

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.

ISHII T. 1997. Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci*. 127:111-127.

JACQUET G., POLLET B., LAPIERRE C., MHAMDI F., ROLANDO C. 1995. New ether-linked ferulic acid-coniferyl alcohol dimers identified in grass straws. *J Agric Food Chem*. 43:2746-2751.

LAM T.B.T., KADOYA K., IYAMA K. 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and *p*-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β -position, in grass cell walls. *Phytochem*. 57:987-992.

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.

NAIR R.B., BASTRESS K.L., RUEGGER M.O., DENAULT J.W., CHAPPLE C. 2004. The *Arabidopsis thaliana* REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1 Gene Encodes an Aldehyde Dehydrogenase Involved in Ferulic Acid and Sinapic Acid Biosynthesis. *The Plant Cell*. 16:544-554.

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

SÁNCHEZ M., PENA M.J., REVILLA G., ZARRA I. 1996. Changes in dehydrodiferulic acids and peroxidase activity against ferulic acid associated with cell walls during growth of *Pinus pinaster* hypocotyl. *Plant Physiol.* 111:941-946.

SHOICHET B.K. Virtual screening of chemical libraries. 2004. *Nature.*16(432):862-865.

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 04 2012.

INTERAÇÕES QUÍMICAS ENTRE PLANTAS

Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho
Anderson Ricardo Soares
Gisele Adriana Bubn
Hingrid Ariane da Silva
Jennifer Munik Bevilaqu
Rita de Cássia Siqueira Soare
Maria de Lourdes Lúcio Ferrarese

O termo alelopatia foi originalmente sugerido por Hans Molish, em 1937, para definir o fenômeno da interinfluência entre plantas (incluindo microorganismos), sem a necessidade de contato físico (Tang et al., 1995). Tal interação à distância é promovida pela liberação de bioativos para o ambiente por um produtor e sua absorção pelo receptor (Rice, 1984). O estabelecimento de relações causais entre cada um deles e os efeitos alelopáticos é complexo: um mesmo organismo produz e segrega inúmeros aleloquímicos; estes uma vez liberados interagem entre si e com outros agentes bióticos e abióticos do meio. Além disso, cada espécie vegetal desenvolveu um modo próprio de responder ao estresse alelopático. Assim, de um modo geral, infere-se que a interação alelopática depende da concentração e estabilidade dos aleloquímicos, da atividade microbiana e da resistência da planta (Blum et al., 1984). Os compostos com ação alelopática são primordialmente oriundos do metabolismo secundário. Dentre os milhares de aleloquímicos destacam-se os compostos fenólicos, os terpenos e os compostos nitrogenados entre os quais os aminoácidos não-protéicos, motivo do presente estudo.

Os aleloquímicos interferem em muitos processos vitais das plantas e sua atuação não é específica. As funções prejudicadas, com maior frequência, são a utilização de água e assimilação de nutrientes (Lyu e Blum, 1990; Bergmark et al., 1992; Booker et al., 1992), o crescimento de raízes e expansão de folhas (Blum e Dalton, 1985), a fotossíntese e a síntese de proteínas (Mersie e Singh, 1993), a respiração celular e a permeabilidade da membrana celular e atividades enzimáticas (Baziramakenga et al., 1995; Politycka, 1996, 1997, 1998).

Grande parte dos estudos no campo da alelopatia está voltada para o isolamento e identificação de estruturas dos compostos que causam efeito alelopático. Há abundantes informações sobre as estruturas químicas e aspectos pertinentes de sua

interação com o ambiente. Entretanto, investigações mais consistentes voltadas à absorção desses compostos (Lehman e Blum, 1999; Ferrarese et al., 2000; Silva et al., 2000, Herrig et al., 2000), bem como seus efeitos metabólicos nas plantas (Baleroni, 1999; Baleroni et al., 2000; Herrig et al., 2002; Ng et al., 2003; Doblinski et al., 2003; Santos et al., 2004; Böhm et al., 2006) apontam para a necessidade de maior atenção dos pesquisadores das áreas de fisiologia e bioquímica das plantas.

O maior desafio desses cientistas é determinar o mecanismo de ação dos aleloquímicos. Não existe uma simples equação que explique o modo de ação dos aleloquímicos. Outra questão em aberto, é que não tem sido possível separar, com clareza, os efeitos primários dos secundários. Diferentes componentes estruturais da célula podem sofrer os efeitos dos aleloquímicos, muito embora as perturbações a nível de membrana indicam ser este o ponto inicial para as múltiplas ações destes compostos. Os dados obtidos até o momento levam a crer que a atividade destes compostos, sobre as membranas, desencadeia subseqüentes alterações fisiológicas. É possível que a fitotoxicidade de muitos destes compostos não seja devida a um sítio localizado de interferência, mas talvez decorrente da ação sobre múltiplos sítios (Einhellig, 1995). Além disso, um dos grandes déficits de conhecimento acerca das atividades dos aleloquímicos é uma clara explicação para as diferenças de sensibilidade entre as espécies. Não há um aleloquímico genérico! Diferentes modos de ação dentre os inúmeros compostos são possíveis, e têm sido freqüentemente relatados (Macias, 1995).

Como se nota, estudos sobre a ação de aleloquímicos, sua absorção pelas raízes, seus efeitos sobre o metabolismo celular constituem, de um modo geral, assunto indiscutivelmente fascinante. A variabilidade das respostas, os controversos efeitos sobre as espécies estudadas são pontos que desafiam os pesquisadores na busca do entendimento do modo de ação desses compostos.

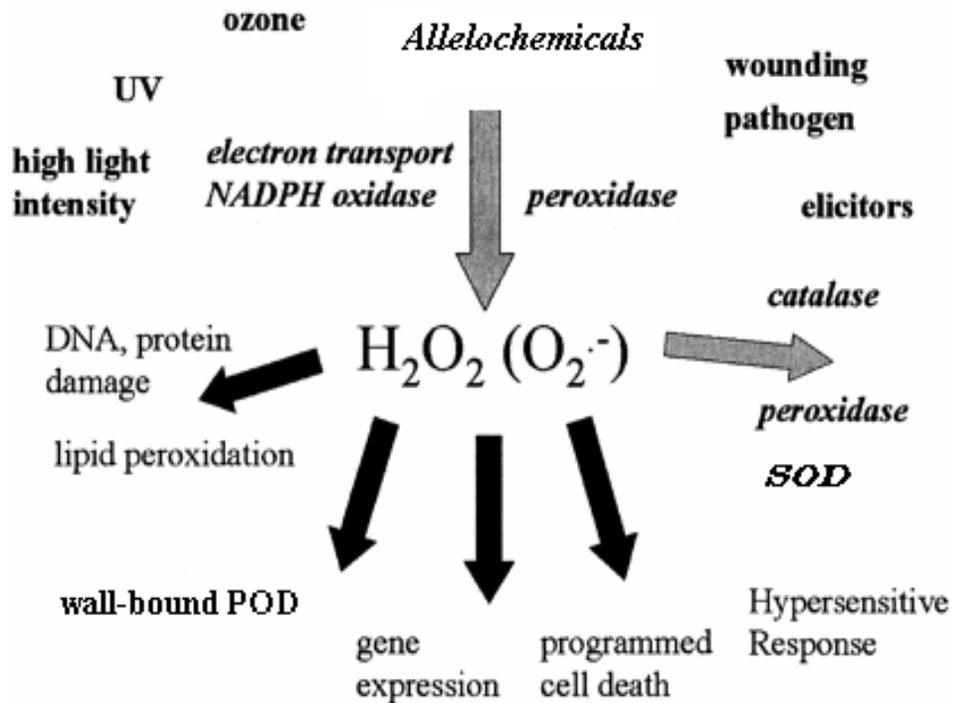
Estresse Oxidativo

Muitos dos processos deletérios sofridos por plantas submetidas às condições adversas são também mediados por radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxil (OH^{\bullet}), gerados em diferentes compartimentos celulares como consequência do funcionamento inadequado das vias metabólicas e em processos fisiológicos normais (Allen, 1995; Apel e Hirt, 2004). Estas moléculas reativas, especialmente OH^{\bullet} , são altamente destrutivas para lipídios, ácidos nucleicos e proteínas podendo ocasionar a

morte celular. De um modo geral tem sido aceito que EROs, ao lado de outros mediadores como o Ca^{2+} , atuam como mensageiros secundários nas respostas aos estresses bióticos e abióticos e na sinalização hormonal. Neste cenário, H_2O_2 , que é relativamente estável e difusível através das membranas, é reconhecido atualmente como uma molécula sinalizadora, atuando em diversas respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares, tanto em nível celular como da planta inteira. Assim, a adição de H_2O_2 ou a sua produção experimental em tecidos vegetais tem demonstrado que esta espécie química atua como sinal indutor da expressão gênica de diversas proteínas, entre elas, enzimas antioxidativas. Outro aspecto não menos importante, é que EROs como $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 são também requeridas para lignificação (Buchanan et al., 2000).

Existem vários processos biológicos capazes de provocar reduções eletrônicas gerando EROs. Todas estas espécies são mais reativas que o O_2 e, em consequência, mais tóxicos (Boveris, 1984; Fridovich, 1998). EROs podem se originar nas mitocôndrias, via cadeia respiratória. A NADH desidrogenase e a ubiquinona, nas formas reduzidas, são capazes de transferir elétrons ao O_2 gerando $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Gardner e Boveris, 1990). Além disso, peroxissomos vegetais contém várias oxidases capazes de produzir $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Del Rio et al., 1998). Entretanto, a fonte mais importante de EROs nas plantas é o cloroplasto. Muitos intermediários da cadeia transportadora de elétrons são encontrados na forma reduzida, o que aumenta o risco de transferência de elétrons ocasionando a formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Palatnik et al., 2002). Após sucessivas reações esta espécie química pode gerar significativo número de espécies reativas. Normalmente, os mecanismos protetores das células (antioxidantes e enzimas antioxidantes, por exemplo) podem eliminar estes compostos sem maiores dificuldades. Todavia, quando estes sistemas de defesa falham, ou quando aumenta anormalmente a produção de EROs, o balanço entre oxidantes e antioxidantes favorece os primeiros e se estabelece a condição conhecida como estresse oxidativo. A resposta das plantas ao estresse oxidativo está relacionada a produção e ativação de enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), peroxidase solúvel (POD), e a superóxido dismutase (SOD) (Salt, 2001). A POD tem ação sobre o H_2O_2 e necessita de alguns compostos orgânicos como fonte de equivalentes redutores. A CAT é também responsável por inativar H_2O_2 . Nesta reação uma das duas moléculas de H_2O_2 é oxidada a oxigênio molecular, e a segunda é reduzida a água. A SOD compreende duas formas: citoplasmática (SOD1)-Cu/Zn e a mitocondrial (SOD2)-Mn. A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em

oxigênio e H_2O_2 , que pode ser posteriormente degradado pela CAT ou POD (Halliwell e Gutteridge, 2000). A peroxidação lipídica, que é uma das conseqüências da produção de EROs, é um indicador utilizado para se avaliar nas plantas o nível do estresse oxidativo presente (Verma e Dubey, 2003).



Danos indiretos podem ocorrer pela produção de EROs, via redução direta de peróxidos ou via redução de O_2 molecular para radicais superóxidos e subsequente dismutação destas espécies para H_2O_2 ; na presença de alguns íons metais de transição H_2O_2 pode formar radicais HO^{\cdot} .

O mecanismo de ação de um antioxidante é bem variado, desde a remoção do oxigênio do meio, varredura dos EROs, seqüestro dos metais catalisadores da formação dos radicais livres, aumento da geração de antioxidantes endógenos ou mesmo a interação de mais de um mecanismo. Nas plantas, os antioxidantes incluem proteínas hidrolisadas e compostos fenólicos como os flavonóides e derivados do ácido cinâmico. Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, que conferem propriedades antioxidantes (Kerry e Abbey, 1997; Bravo, 1998).

Na tentativa de se elucidar as diferenças de potencial antioxidante existentes entre os ácidos fenólicos, foi realizada uma comparação quantitativa do comportamento cinético da inibição da oxidação de alguns ácidos benzóicos (ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico, e 3,4-dihidroxibenzóico) e cinâmicos (ácidos *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e caféico) (Marinova e Yanishlieva, 1992). Os autores relataram que um maior potencial antioxidante foi encontrado quando há duas hidroxilas nas posições 3 e 4, estrutura apresentada pelos ácidos caféico e 3,4-diidroxibenzóico.

OBJETIVOS GERAIS

1. Analisar o potencial alelopático do L-DOPA sintético, sobre o crescimento das plântulas de soja;
2. Avaliar em espectrofotômetro a atividade das enzimas antioxidantes: peroxidase e superóxido dismutase de raízes de plântulas de soja tratadas com L-DOPA;
3. Demonstrar a atividade da peroxidase em gel de poliacrilamida;
4. Quantificar a peroxidação dos lipídios nas raízes de plântulas de soja controle e tratadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Procedimentos Gerais

Sementes de soja foram acondicionadas em papel Germitest e postas a germinar (câmara escura, 25°C e 72 h). A seguir, 25 plântulas foram submetidas à incubação de 24 horas, em câmara de germinação com aeração (25°C, fotoperíodo de 12h) em solução nutritiva pH 6,0, contendo ou não L-DOPA (0,5mM). As raízes foram medidas antes e após incubação, determinando as diferenças entre os comprimentos iniciais e finais. Os resultados foram expressos em centímetros (Herrig et al, 2002).

Determinação da atividade da peroxidase solúvel

Para determinar a atividade das peroxidases (EC 1.11.1.7) raízes frescas de plântulas de soja, desenvolvidas nas condições já descritas serão maceradas com tampão fosfato (0,5 g de tecido em 5,0 ml de tampão) 67 mM pH 7,0 (Ferrarese, 2000). A suspensão será centrifugada a 1700 xg por 15 minutos, sob refrigeração e o sobrenadante utilizado como extrato de peroxidase solúvel.

A determinação da atividade da peroxidase será baseada nos estudos desenvolvidos por Cakmak e Horst (1991). O meio de reação conterá tampão fosfato 25 mM pH 6,8, água oxigenada e guaiacol. As concentrações finais, num volume de 3,0 ml, serão 2,58 mM e 10 mM para guaiacol e água oxigenada, respectivamente. A reação será iniciada com adição do extrato enzimático (400µL). A oxidação do guaiacol será acompanhada durante 5 minutos em espectrofotômetro, em 470 nm, contra branco contendo 2,6 ml do meio de reação.

A atividade da peroxidase será calculada usando um coeficiente de extinção de $25,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Devi e Prasad, 1996) para tetraguaiacol, o produto da reação. Os resultados serão expressos em µmoles de tetraguaiacol formados por minuto por g de biomassa fresca.

Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1. 15.1.1)

A atividade da SOD será determinada de acordo com o método de Giannopolitis e Ries (1977), tendo como base a capacidade da enzima converter superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Será utilizado no sistema de reação tampão fosfato de potássio pH 7,8 (50mM), *nitro blue tetrazolium* (NBT) 75 µM, L-metionina 13mM, riboflavina 4 µM e o extrato enzimático, totalizando 1,5 mL. A mistura de reação será mantida a 25°C, sob iluminação, por um período de dez minutos. A redução do NBT será determinada através de leitura de absorbância em espectrofotômetro a 560 nm.

Uma unidade enzimática (U) da atividade da SOD expressa em $\text{U mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ será definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da razão de redução de NBT medida a 560nm.

Determinação da peroxidação lipídica

O nível de peroxidação lipídica, quantificado pela medida do acúmulo de malondialdeído (MDA) - um produto da peroxidação de ácidos graxos insaturados - será baseado no procedimento descrito por Baziramakenga et al. (1995) com pequenas modificações. Para isso será utilizado o extrato de peroxidase solúvel obtido conforme descrito acima. A uma alíquota de 0,5 ml do extrato enzimático serão adicionados 4 ml

de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (em 20% de ácido tricloroacético) e a mistura acondicionada em banho maria, a 90°C, durante 10 minutos. Após este período a mistura será resfriada em banho de gelo durante 15 minutos. A amostra será centrifugada a 3500 g por 5 minutos e a absorbância do sobrenadante (complexo colorido MDA-TBA) será determinada em 532 nm. O valor obtido será subtraído de uma absorbância inespecífica obtida em 600 nm. utilizando um espectrofotômetro. O conteúdo de MDA será calculado com o valor do coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os valores de MDA produzido serão expressos em μmoles por grama de biomassa fresca de raiz.

Atividade da peroxidase em gel de poliacrilamida

A eletroforese será conduzida a 4°C em corrente constante de 20 mA/placa em tempo médio de corrida de 4 horas. Será aplicado no gel $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína total solúvel de extrato de raiz de soja. Para revelação, o gel será colocado em solução contendo tampão fosfato 0,1M pH 6,0 e guaiacol durante 10 min e em seguida H_2O_2 . Após a coloração, o gel será lavado em água deionizada e fixado em ácido acético 7%.

REFERÊNCIA

- ALLEN, R.D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology*, v.107, p.1049-1054, 1995.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology and Plant Molecular Biology*, v.55, p.373-399, 2004.
- BALERONI, C. R. S.; FERRARESE, M.L.L.; BRACCINI, A.L.; SCAPIM, C.A.; FERRARESE-FILHO, O. Effects of ferulic and *p*-coumaric acids on canola (*Brassica napus* L. cv. Hyola 401) seed germination. *Seed Science and Technology*, v.28, p.333-340, 2000.
- BALERONI, C.R.S. Germinação de sementes e composição de ácidos graxos em cotilédones de canola (*Brassica napus* L.) sob influência de ácidos fenólicos. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 72p. Dissertação de Mestrado - Produção Vegetal, 1999.
- BAZIRAMAKENGA, R.; LEROUX, G.D.; SIMARD, R.R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *Journal of Chemical Ecology*, v.21, p.1271-1285, 1995.
- BERGMARK, C. L.; JACKSON, W. A.; VOLK, R. J.; BLUM, U. Differential inhibition by ferulic acid of nitrate and ammonium uptake in *Zea mays* L. *Plant Physiology*, v.98, p.639-645, 1992.
- BLUM, U.; DALTON, B. R. Effects of ferulic acid, an allelopathic compound, on leaf expansion of cucumber seedlings grown in nutrient culture. *Journal of Chemical Ecology*, v.11, p.279-301, 1985.
- BLUM, U.; DALTON, B. R.; RAWLINGS, J. O. Effects of ferulic acid and some of its microbial metabolic products on radicle growth of cucumber. *Journal of Chemical Ecology*, v.10, p.1169-1191, 1984.
- BÖHM, P.A.F.; ZANARDO, F.M.L.; FERRARESE, M.L.L.; FERRARESE-FILHO, O. Peroxidase activity and lignification in soybean root growth-inhibition. *Biologia Plantarum*, v.50, p.315-317, 2006.
- BOOKER, F. L.; BLUM, U.; FISCUS, E.L. Short-term effects of ferulic acid on ion uptake and water relations in cucumber seedlings. *Journal of Experimental Botany*, v.43, p.649-655, 1992.
- BOVERIS, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymology*, v.105, p.429-435, 1984.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; RUSSELL, J.L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, p.1158-1203, 2000.

- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition Reviews*, New York, v.56, p.317-333, 1998.
- CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, v.83, p.463-468, 1991.
- DEL RIO, L.A.; PASTORI, G.M.; PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F.J.; JIMÉNEZ, A.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; HERNÁNDEZ, J.A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology*, v.116, p.1195-1200, 1998.
- DOBLINSKI, P. M. F; FERRARESE, M. L. L.; HUBER, D. A.; SCAPIM, C. A.; FERRARESE FILHO, O. Peroxidase and lipid peroxidation of soybean roots in response to *p*-coumaric and *p*-hydroxybenzoic acids. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.46, p.193-198, 2003.
- EINHELLIG, F.A. Allelopathy. Current status and future goals. In: Inderjit, Dakshini K.M.M., Einhellig F.A. (eds) *Allelopathy. Organisms, Processes and Applications*, New York: American Chemical Societies, Series 582. p.1-24, 1995.
- FERRARESE, M.L.L.; FERRARESE-FILHO, O.; RODRIGUES, J. D. Ferulic acid uptake by soybean root in nutrient culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.22, p.121-124, 2000.
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, v.201, p.1203-1209, 1998.
- GARDNER, J.F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochemical Journal*, v.191, p.421-427, 1990.
- GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K. (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **59**: 309-314.
- HALLIWELL. B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3 ed. Clarendon. Oxford, 2000.
- HERRIG, V.; FERRARESE, M.L.L., SUZUKI, L.S., RODRIGUES, J.D., FERRARESE-FILHO, O. Peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities, phenolic acid contents, and allelochemicals-inhibited root growth of soybean. *Biological Research*, v.35, p.51-58, 2002.
- HERRIG, V.; SILVA. H.C; FERRARESE, M.L.; FERRARESE-FILHO, O. Ferulic acid depletion by cultured soybean seedlings under action of glucose and methionine. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.43, p.515-518, 2000.

- KERRY, N.L.; ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, Limerick, v.135, p.93-102, 1997.
- LEHMAN, M.E.; BLUM, U. Evaluation of ferulic acid uptake as a measurement of allelochemical dose: effective concentration. *Journal of Chemical Ecology*, v.25, p.2585-2600, 1999.
- LYU, S-W; BLUM, U. Effects of ferulic acid, an allelopathic compound, on net P, K, and water uptake by cucumber seedlings in a split-root system. *Journal of Chemical Ecology*, v.16, p.2429-2439, 1990.
- MACIAS, F. Allelopathy in the search for natural herbicides model. Allelopathy. Current status and future goals. In: *Allelopathy. Organisms, Processes and Applications* (Inderjit, Kakshini, K. M. M., and Einhellig, F. A. eds.), New York: American Chemical Societies. Series 582, p.311-329, 1995.
- MARINOVA, E.M., YANISHLIEVA, N.V. Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. *Fett-Wissenschaft Technologie*, Leinfelden-Echterdingen, v.94, p.428-432, 1992.
- MERSIE, W.; SINGH, M. Phenolic acids affect photosynthesis and protein synthesis by isolated leaf cells of velvet-leaf. *Journal of Chemical Ecology*, v.19, p.1293-1301, 1993.
- NG, P.L.L.; FERRARESE, M.L.L.; HUBNER, D.A.; RAVAGNANI, A.L.S.; FERRARESE-FILHO, O. Canola (*Brassica napus* L.) seed germination influenced by cinnamic and benzoic acids and derivatives: effects on peroxidase. *Seed Science and Technology*, v.31, p.39-46, 2003.
- PALATNIK, J.F.; VALLE, E.M.; CARRILLO, N. Oxidative stress and damage in chloroplasts from dawn to dusk. *Advances in Plant Physiology*, v.4, p.75-88, 2002.
- POLITYCKA, B. Free and glucosylated phenolics, phenol- β -glucosyltransferase activity and membrane permeability in cucumber roots as affected by derivatives of cinnamic and benzoic acids. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.19, p.311-317, 1997.
- POLITYCKA, B. Peroxydase activity and peroxidation lipidic in roots of cucumber seedlings influenced by derivatives of cinnamic and benzoic acids. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.18, p.365-370, 1996.
- POLITYCKA, B. Phenolics and the activities of phenylalanine ammonia-lyase, phenol- β -glucosyltransferase and β -glucosidase in cucumber roots as affected by phenolic allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum*, v.20, p.405-410, 1998.
- RICE, E. L. *Allelopathy*. Academic Press, Orlando, 1984.

- SANTOS, W.D.; FERRARESE, M.L.L.; FINGER, A.; TEIXEIRA, A.C.N.; FERRARESE-FILHO, O. Lignification and related enzymes in soybean root growth-inhibition by ferulic acid. *Journal of Chemical Ecology*, v.30, p.1199-1208, 2004.
- SILVA, H. C.; HERRIG, V.; FERRARESE, M.L.L.; FERRARESE-FILHO, O. Consumption of ferulic acid and p-hydroxybenzoic acids by soybean root tips. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.43, p.281-284, 2000.
- TANG, C.S.; CAI, W.F.; KOHL, K.; NISHIMOTO, R.K. *Plant Stress and Allelopathy*. ACS symposium Series 558; American Chemical Society. Washington, DC, p.142-157, 1995.
- VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, v.164, p.645-655, 2003.
- VIMALA-DEVI, P.S., PRASAD, Y.G., 1996. Compatibility of oils and antifeedants of plant origin with the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 68, 91–93.