



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Área de concentração: Biologia Celular e Molecular



V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular

27 a 31 de Julho de 2015

Inscrições:

03/05 a 17/06

Inscrições e mais informações:

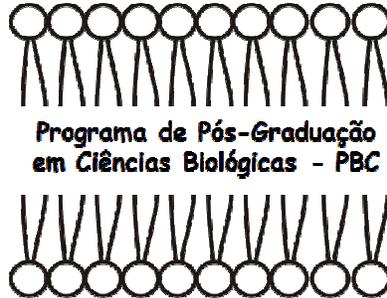
www.pbc.uem.br



Avaliação Trienal

Conceito 5

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015



Coordenador:

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Coordenadora Adjunta:

Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez

Secretario:

Nelsino Mitsuo Nogai

Universidade Estadual de Maringá

Bloco I89, Sala 02

Fone: 55 (0xx44) 3011-4908 – Fax: 55 (0xx44) 3011-4957

E-mail: sec-pbc@uem.br

Av. Colombo, 5790, Jardim Universitário, CEP 87.020-900

Maringá, Paraná, Brasil

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Agradecimentos e Apoio



Minicurso 01

Citogenética de Peixes: do Clássico ao Molecular

Laboratório de Citogenética de Peixes (Bloco H67/sala 09)

Orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza de Brito Portela Castro

Ministrantes: Ana Camila Prizon, Andréa Cius, Vera Lucia Lopes e Isabelle Pereira

Mari

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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 (Artoniet 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 “*insitu*”) 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

Introduzir as metodologias de obtenção de cromossomos de peixes, de técnicas de bandamentos C e Ag-NORs (regiões organizadoras de nucléolos) e de citogenética molecular (FISH).

Objetivos específicos

- Obter cromossomos mitóticos através da técnica de suspensão celular.
- Caracterizar a morfologia cromossômica da espécie alvo.
- Empregar as técnicas de bandeamento 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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

MATERIAS E MÉTODOS

1. Análises citogenéticas

As análises citogenéticas de cromossomos mitóticos serão feitas com base em técnicas convencionais e de bandeamentos 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:

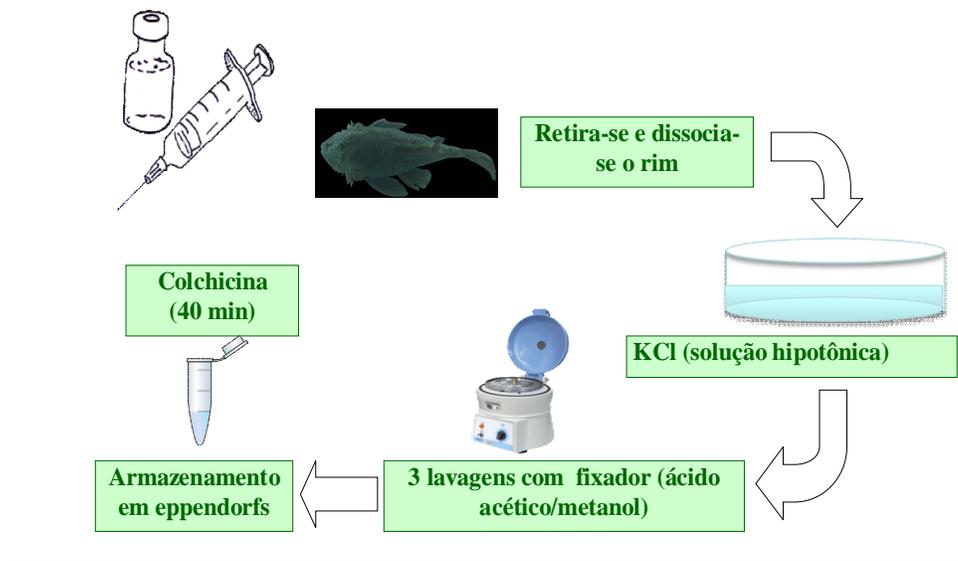
As preparações do material, para análise dos cromossomos mitóticos, serão feitas utilizando-se a porção cefálica do rim, de acordo com a técnica “air drying” descrita por Egozcue (1971) e modificada para peixe por Bertollo (1978).

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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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



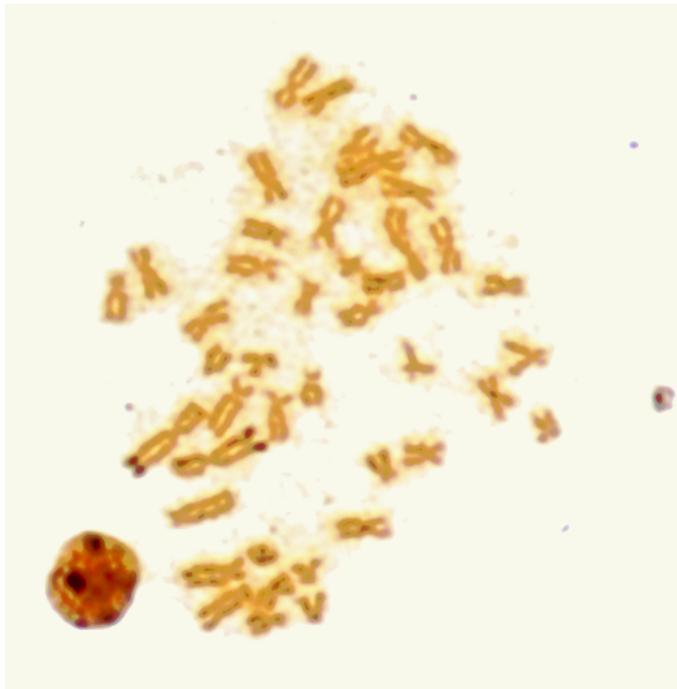
5. Bandeamentos Cromossômicos:

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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 (AgNO_3), 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.

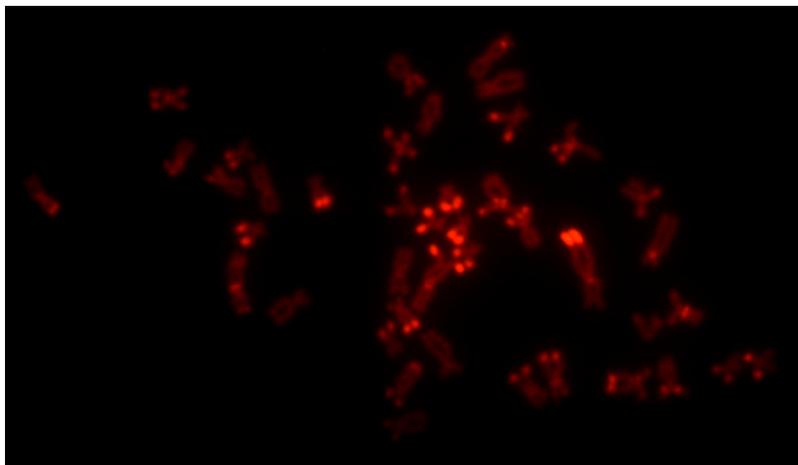


5.2.1Bandeamento C - SUMNER (1972)

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 $2\times\text{SSC}$, 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 $2\times\text{SSC}$ a

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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. Hibridação in situ por fluorescência - (FISH) com sondas de DNAr 18S e 5S - PINKEL et al. (1986)

Serão utilizadas duas sondas para o mapeamento físico destas sequências sobre os cromossomos: uma sonda de DNAr 18S, obtida do DNA nuclear de *Prochilodusargenteus* (HATANAKA e GALETTI, 2004) e uma sonda de DNAr 5S, isolada a partir do DNA genômico de *Leporinuselongatus* (MARTINS e GALETTI, 1999) e uma sonda para sequência telomérica de eucariotos (IJDO et al., 1991).

6.1. Marcação da sonda por Nick Translation (Kit Bionick Labeling System)

Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo: xl água qsp; 7,5l de dNTP Mix 10x com dATP mais biotina; x l de DNA sonda (equivalente a 1,6 g); 7,5 l de Enzima (DNase + DNA polimerase I) (o volume final da reação deve ser 45 l e o volume de água a ser colocado dependem da concentração da sonda). Misturar, centrifugar brevemente (cerca de 5 Seg) e incubar a 16°C durante 2 horas. Terminada às 2 horas coloque o tubo no gelo e cheque em gel o tamanho dos fragmentos (deve ser menor que 500 pb). Adicionar 7,5 l de stop buffer. Precipitar o DNA com 5 l de acetato

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

de sódio 3M e 100 l de etanol PA. Incubar a -20°C overnight. Centrifugar a 14.000 rpm por 10 min. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet com 50 l etanol 70%. Centrifugar a 14.000 rpm 5 min. Descartar o sobrenadante, secar em estufa a 37°C e diluir em xl de água (para uso imediato) ou TE (para ser armazenada por um período maior).

6.2. Marcação da sonda por Nick Translation (Kit Nick Translation Biotin ou Digoxigenin)

Pipetar os seguintes componentes em tubo de 1,5 ml no gelo: x l água qsp; x l sonda (1g); 4 l mix de nick (Completar para o volume total de 20 l). Interromper com 1 l de EDTA 0,5 M pH 8,0. Aquecer por 10 min à 65°C .

6.3. Fluorescent in situ hybridization

Tratamento com RNase: Lavar as lâminas em tampão PBS 1x durante 5 min. em temperatura ambiente (shaker). Desidratar as lâminas em série alcoólica 70, 85 e 100%, 5 min cada (secar). Incubar as lâminas em 100 l de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37°C por 1h em câmara úmida com água milli-Q. Lavar 3 x por 5 min em 2xSSC. Lavar durante 5 min em PBS 1x.

Fixação: Fixar em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl_2 durante 10 min a temperatura ambiente. Lavar em PBS 1x por 5 min. (shaker). Desidratar as lâminas em série alcoólicas (70, 85, 100 %) por 5 min cada.

Pré-hibridação: Simultaneamente a desidratação em série alcoólica desnaturar a solução de hibridação a 100°C por um período de 10 min e passá-la imediatamente ao gelo. Desnaturar o DNA cromossômico com formamida 70% em 2xSSC a 70°C por 5 min. Desidratar o material em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada.

Hibridação: Preparar a câmara úmida a 37°C . Montar cada lâmina com 40 l de solução de hibridação, cobrir com lamínula e deixar overnight a 37°C . (Solução de Hibridação: (estringência 77%) duas sondas (DOUBLE FISH) (200 μl Formamida (50% de Formamida); 80 μl Sulfato de Dextrano 50% (conc final de 10%); 40 μl de 20xSSC (conc final 2xSSC); 8 μl DNA de placenta 10mg/ml (1 μl / lâmina); 36 μl de H_2O qsp. Acrescentada a sonda A; 36 μl de H_2O qsp. Acrescentada a sonda B; Volume final 400 μl).

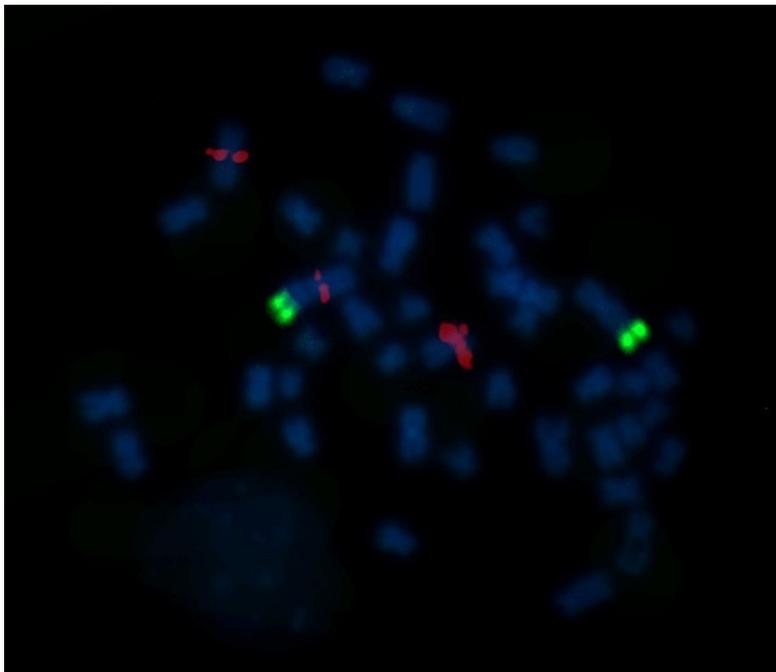
Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Lavagens: Lavar 2 vezes em formamida 15%/0,2xSSC pH 7.0 a 42°C durante 10min cada (Shaker). Lavar durante 5min em solução de Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker).

Bloqueio: Incubar as lâminas em tampão 5% NFDM/4xSSC por 15 minutos. Obs: Antes de incubar alicotar 5 tubos com 1000 l cada do tampão 5% NFDM/4xSSC. Lavar 2 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker);

Detecção de duas sondas DOUBLE FISH: Montar um mix contendo 994 µl NFDM + 1µl de avidina FITC conjugada + 5µl de antidigoxigeninarodamina conjugada. Incubar as lâminas com 100 l cada do mix de anticorpos durante 1 h em câmara úmida e escura, a temperatura ambiente. Lavar 3 x 5min com Tween 0,5%/4xSSC, ambiente (Shaker). Desidratar em álcool 70, 85 e 100%, 5 min. cada (secar).

Montagem das lâminas com DAPI: Misturar 400 l de antifading mais 1 l de dapi (0,2 mg/mL). Colocar 50 l da mistura e cobrir com lamínula. Guardar no escuro.



7. Medidas cromossômicas:

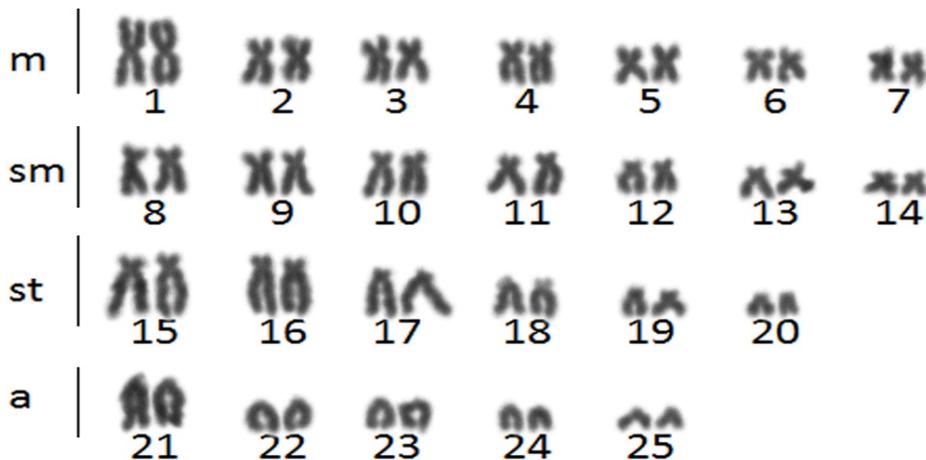
Os cromossomos terão sua morfologia estabelecida de acordo com a relação de braços (RB), segundo as proporções propostas por Levan et al. (1964), e serão

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

classificados em: metacêntricos (RB de 1,00 a 1,70), submetacêntricos (RB de 1,71 a 3,00), subteloentríco (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), subteloentrícos (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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

LEVAN, A., FREDGA, K. and SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas** 52: 201-220, 1964.

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

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

PINKEL, D., STRAUME T. and GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization.**Proc Natl Acad Sci USA**, 83: 2934-2938, 1986.

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.

Minicurso 02

Atividade Antimicrobiana de Produtos Naturais e Sintéticos

Laboratório de Inovação Tecnológica do Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos
(Bloco B08/sala 06)

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Ministrantes: Francielle Pelegrin Garcia, Hélio Volpato, Jean Henrique da Silva

Rodrigues, Jessica Carreira de Paula e Fabianne Martins Ribeiro

INTRODUÇÃO

O nascimento da quimioterapia antimicrobiana ocorreu há mais de 100 anos pelo bacteriologista alemão Paul Erlich. Entusiasmado com a eficácia dos compostos derivados do arsênico para o tratamento da doença do sono, ele convocou uma equipe para encontrar um composto que combatesse a sífilis (SEPKOWITZ, 2011). Seu sonho era encontrar uma substância que tivesse afinidade pelos patógenos sem afetar as células do hospedeiro, que foi nomeada por ele como “bala mágica”. Foram mais de 600 compostos sintetizados, até que o composto número 606 (arsfenamina – nome comercial: Salvarsan) se enquadrou neste quesito para a época (BOSCH & ROSICH, 2008).

A arsfenamina foi o composto de escolha para o tratamento da sífilis até a descoberta ao acaso da penicilina por Alexander Fleming em 1928. Podemos dizer que foi Fleming que desenvolveu as técnicas *in vitro* para a descoberta de novos antimicrobianos (AMSTERDAM, 2005). Nota-se então que a corrida para a descoberta de novos antimicrobianos depende de muito trabalho e também de sorte, esta como disse Louis Pasteur só favorece a mente preparada.

Nosso laboratório vem se destacando como referência na prospecção de drogas que possuam atividade antimicrobiana, dentre os micro-organismos testados incluem bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*), bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), leveduras (*Candida albicans*)

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

e protozoários (*Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*). O presente minicurso se propõe a apresentar as principais técnicas utilizadas no estudo de antimicrobianos, sendo o enfoque das metodologias no estudo de novos compostos com atividade anti-*Leishmania*.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são responsáveis por causar as leishmanioses, que são predominantes em 88 países de 4 continentes. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses ameaçam aproximadamente 350 milhões de pessoas (WHO, 2001a) e estima-se que por ano ocorram 1,6 milhões de novos casos (WHO, 2001b).

As leishmanioses podem ser divididas em duas formas clínicas: tegumentar e visceral. Estas diferentes formas são manifestadas dependendo da espécie do protozoário e do sistema imunológico do hospedeiro. A leishmaniose tegumentar (LTA) acomete principalmente pele e mucosas, podendo ser dividida em cutânea localizada, cutânea difusa e cutaneomucosa (CROFT & COOMBS, 2003; GENARO & REIS, 2005; NGURE et al., 2009). A leishmaniose visceral (LV), conhecida como calazar, é a forma mais grave. Nesta ocorre disseminação do protozoário por todo o sistema fagocítico mononuclear, podendo levar o paciente a óbito se o mesmo não for submetido ao tratamento específico (MICHALICK & GENARO, 2005).

O Ministério da Saúde registrou no período de 2000 a 2012, no Brasil, um total de 372.601 casos confirmados de leishmaniose, sendo 87,89% de LTA e 12,1% de LV. Dentre os casos de LV, houve 2.920 óbitos (Portal da Saúde).

Os dípteros dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* da família Psychodidae são os vetores da leishmaniose. São insetos geralmente de pequeno porte, apresentam cerdas longas que cobrem o corpo e as patas. Possuem atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrangendo-se durante o dia em lugares húmidos, sombrios e protegidos do vento. Nesta família, apenas as fêmeas são hematófagas. São conhecidos popularmente como mosquito-palha ou birigui (DE CARVALHO & MORENO 2001; MURRAY et al., 2005; FIOCRUZ).

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903) é composto por protozoários unicelulares, heteroxênicos, pertencentes à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*. De acordo com características fenotípicas, as espécies de *Leishmania* que infectam o homem podem ser divididas em subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (LAINSON

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

&SHAW, 1987). As espécies *L. amazonensis* (*Leishmania*) e *L. braziliensis* (*Viannia*) são responsáveis pela leishmaniose cutânea e mucocutânea, respectivamente.

Durante o ciclo de vida, o parasito apresenta duas formas distintas: promastigota e amastigota. A forma promastigota apresenta flagelo livre, sendo encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado. A forma amastigota não possui flagelo livre, sendo encontrada no interior das células do hospedeiro vertebrado, principalmente nos macrófagos (MICHALICK, 1995).

O ciclo de vida deste parasito inicia-se durante o repasto sanguíneo, quando a fêmea do inseto inocula formas promastigotas no hospedeiro vertebrado, que são rapidamente fagocitadas por macrófagos teciduais e se transformam em formas amastigotas intracelulares obrigatórias. Os protozoários estabelecem-se no fagolisossomo dos macrófagos, resistindo à ação destruidora das enzimas lisossomais, multiplica-se por fissão binária até romper a célula hospedeira. As amastigotas liberadas são novamente fagocitadas por outros macrófagos. A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, onde formas amastigotas são adquiridas com o sangue e/ou linfa intersticial. No intestino do inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas, completando o ciclo biológico do protozoário (MICHALICK, 1995; GREVELINK & LERNER, 1996).

Embora sejam consideradas células eucarióticas, os protozoários do gênero *Leishmania*, apresentam características exclusivas do grupo dos tripanossomatídeos, como a presença de uma única mitocôndria, que se estende por todo o corpo celular, tendo uma porção diferenciada denominada de cinetoplasto, que possui um arranjo complexo de DNA, conhecido como DNA citoplástico (kDNA) (SOUZA et al., 1997; VANNIER-SANTOS et al, 2002; CAVALCANTI et al., 2008).

Outras organelas distintas dos mamíferos também são encontradas, como por exemplo, o glicossomo e o acidocalcissomo. O glicossomo é uma estrutura delimitada por membrana que contém enzimas responsáveis pelo metabolismo de açúcares (OPPERDOES & COOMBS, 2007). O acidocalcissomo é uma organela que armazena cálcio, e também, é rica em pirofosfato, magnésio, sódio e potássio (MIRANDA et al., 2000; MORENO & DOCAMPO, 2003). Possui várias funções, como manutenção do equilíbrio do pH intracelular e osmorregulação, devido à presença de bombas (Ca^{2+} -ATPase, V-H^{+} -ATPase, H^{+} -PPase) (DOCAMPO & MORENO, 2001; DOCAMPO & MORENO, 2008; MIRANDA et al., 2008).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Mesmo com todas essas características exclusivas destes protozoários, desde a década de 40 o tratamento contra a leishmaniose tem sido restrito a alguns medicamentos, como os derivados dos antimoniais pentavalentes, por exemplo, o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina que são considerados fármacos de primeira escolha (CROFT & COOMBS, 2003). No entanto, estes medicamentos estão longe de serem ideais para o tratamento desta zoonose, pois não são ativos quando administrados oralmente, é necessário longo período de tratamento (CROFT, 1988), causam efeitos tóxicos e frequentemente encontram-se casos que apresentam resistência, e, portanto, outros agentes antiprotozoário precisam ser utilizados (BERMAN, 1996;GREVELINK & LERNER, 1996;BERMAN, 1997).Berman (1988) verificou em ensaios *in vitro* que o tratamento com antimoniais pentavalentes não mostrou efeito leishmanicida sobre formas promastigotas, concluindo que seu efeito se restringia apenas sobre formas amastigotas.

A pentamidina (GENARO & REIS, 1995;GREVELINK & LERNER, 1996) e a anfotericina B (SERENO *et al*, 2000), são considerados quimioterápicos de segunda escolha para o tratamento de pacientes com leishmaniose. O mecanismo de ação das pentamidinas baseia-se na sua ligação ao DNA do cinetoplasto, causando danos ao protozoário (CROFT & COOMBS, 2003). Já o mecanismo da anfotericina B envolve os esteróis da membrana, resultando na perda da permeabilidade celular (SAHA *et al*, 1986;COHEN, 1998). Como as drogas de primeira escolha, a pentamidina (BENNETT, 1996) e a anfotericina B (BERMAN, 1997) causam efeitos colaterais durante o tratamento. Assim, novos fármacos menos tóxicos e mais efetivos têm sido constantemente buscados para o tratamento desta patologia.

OBJETIVOS

Geral

Proporcionar aos alunos conhecimentos sobre técnicas básicas utilizadas para investigar a atividade biológica e mecanismos de ação de substâncias naturais e sintéticas frente aos principais micro-organismos utilizados para a pesquisa de novas drogas.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Específicos

- Verificar uma possível atividade leishmanicida do composto sobre a forma promastigota de *L. amazonensis*;
- Verificar a citotoxicidade do composto sobre a linhagem de células de mamífero L929 (fibroblasto);
- Determinar possíveis mecanismos de ação do composto através de técnicas de fluorímetro e microscopia de fluorescência em formas promastigotas de *L. amazonensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Células

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA) serão cultivadas em meio Warren (Infusão de Cérebro e Coração “Difco[®]”, hemina e ácido fólico) pH 7,0 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – Gibco) e incubadas em estufa a 25 °C. Fibroblastos L929 serão cultivados em meio DMEM suplementado com 10 % SFB e mantidas em estufa a 34 °C e 5% de CO₂.

Ensaio antiproliferativo para avaliação da atividade antiprotozoário

O ensaio antiproliferativo é uma das etapas experimentais iniciais na busca de substâncias com atividade tripanocida. Como objetivo geral do experimento buscase determinar o valor de IC₅₀ para dada substância, ou seja, a concentração de droga na qual ocorra à inibição de 50% dos protozoários após 72 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/sintéticos** 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 Warren (solução estoque (SE): 1000 µg/mL);

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

- Identificar 6 outros tubos eppendorf estéreis (Concentrações: **100, 50, 10, 5, 1 e 0,5 µg/mL**) para realizar a diluição da droga;
- Adicionar aos tubos identificados 500, 800, 500, 800, 500 e 800 µL de meio Warren, respectivamente;
- Homogeneizar e transferir 500 µL da solução estoque para o tubo 1 (C: 100 µg/mL);
- Homogeneizar o tubo 1 e transferir 200 µL deste para o tubo 2 (C: 50 µg/mL);
- Homogeneizar o tubo 2 e transferir 500 µL deste para o tubo 3 (C: 10 µg/mL);
- Homogeneizar o tubo 3 e transferir 200 µL deste para o tubo 4 (C: 5 µg/mL).
- Homogeneizar o tubo 4 e transferir 500 µL deste para o tubo 5 (C: 1 µg/mL).
- Homogeneizar o tubo 5 e transferir 200 µL deste para o tubo 6 (C: 0,5 µg/mL).

Padronização do inoculo

- Formas promastigotas de *L. amazonensis* serão previamente cultivados em meio Warren suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) por 2 dias à 25°C;
- Homogeneizar a garrafa de cultura, retirar 20 µL e adicionar o volume a um eppendorf contendo 980 µL de formalina 3%;
- Contar as formas promastigotas 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;

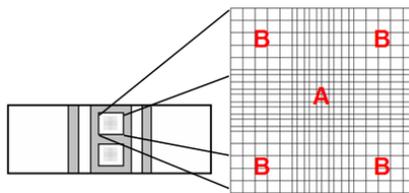


Figura 1. Hematímetro ou Câmara de Neubauer.

- O inóculo para a realização do ensaio antiproliferativo deve ser de 1×10^6 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 1×10^6 parasitos/mL;

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

- 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 $V \times 25 = VR$).

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 Warren em q.s.p. para 25 mL, além de 33,75 µL de gentamicina/estreptomicina.

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 Warren;
- 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 25 °C por 72 h;
- Após o tempo de ensaio realizar a contagem de parasitos em câmara de Neubauer.

Ensaio de citotoxicidade em células L929

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 L929 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 diluída em PBS por aproximadamente 30 segundos;
- Retirar a tripsina/PBS e visualizar no microscópio;
- Adicionar meio de cultura e reservar em gelo;

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

- 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 aos 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 CO_2 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, 1 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$;
- 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 CO_2 por 72 h.

Leitura do experimento

- Após o tempo de incubação retirar o meio de cultura, lavar cada poço com 100 μL de PBS, retirar o PBS e adicionar 50 μL de MTT;
- Incubar na estufa por 4 h;
- Após incubação, retirar o MTT e adicionar 150 μL de DMSO;
- Realizar a leitura em leitor de ELISA a 570 nm.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em *L. amazonensis*

Procedimentos:

- Após tratamento com o composto por 24 h, lavar 2x as células em PBS (3000 rpm por 5 min.);
- Ressuspender em 497,5 µL de PBS e 2,5 µL de H₂DCFDA (5 µg/mL);
- Incubar a temperatura do protozoário por 45 minutos no escuro;
- Adicionar em placa preta de 96 poços 100 µL de cada amostra e realizar leitura em fluorímetro;

Acumulo de inclusões lipídicas em *L. amazonensis*

Procedimentos:

- Após tratamento com o composto por 24 h, lavar 2x as células em PBS (3.000 rpm por 5 min.);
- Ressuspender em 495 µL de PBS e 5 µL de Nile Red (10 µg/mL em DMSO);
- Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro;
- Adicionar em placa preta de 96 poços 100 µL de cada amostra e realizar leitura em fluorímetro e capturar as imagens em microscópio de fluorescência.

REFERÊNCIAS

AMSTERDAM, D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: **Antibiotics in laboratory medicine**, ed Lorian V. (Williams & Wilkins, Baltimore, Md), 5th ed., 2005, p. 61.

BOSCH, F., ROSICH, L. The contributions of paul ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his nobel prize. **Pharmacology**, 82(3):171-9, 2008.

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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

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

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

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

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

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

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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

SEPKOWITZ, K.A. One hundred years of Salvarsan. **N Engl J Med.** **365(4)**:291-3, 2011.

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

Minicurso 03

Métodos Experimentais Para o Estudo da Resposta Inflamatória

Laboratório de Inflamação (Bloco K69/sala 106 b)

Orientadora: Profa. Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado

Ministrantes: Edirlene Sara Wisniewski Rebecca, Bruno Ambrósio da Rocha e Rafael Pazinato Aguiar

INTRODUÇÃO

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

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

Durante a resposta inflamatória, cujo principal objetivo é proteger o organismo e reparar danos, ocorre mudança no fluxo sangüíneo (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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

enzimáticos (SILVA, 2004; ROITT, BROSTOFF e MALE, 2003). 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, 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; GOODMAN e GILMAN, 2003; YOSHIKAI et al, 2001).

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;

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 (MABLEY et al. 2003; CUZZOCREA et al., 2000;HULE; PADMAJA, 1993).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 anti-inflamatória. 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 anti-inflamatórios (SILVA, 2004). Dentre os métodos que avaliam a resposta inflamatória e a atividade anti-inflamatória 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 anti-inflamatórios 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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

em suspensão (porção superior) frente a um agente quimiotáxico (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 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 anti-inflamatório 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 anti-inflamatória 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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

- 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, 2 e 4 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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

- 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 ± erro padrão da média (epm).

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

- Identificar e pesar os camundongos (30 - 40g).
- Realizar tratamento com a substância teste (via tópica).
- Após 1 hora, aplicar 20 µl de óleo de cróton (200 µg) diluído em acetona na face interna da orelha esquerda do camundongo. A orelha direita receberá apenas o veículo (acetona) (20 µl).
- 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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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. 1990. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**. 42, 127-154.

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. 1985. Modulation of mouse ear oedema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. **Agents and Actions**. 17 (2), 197-206.

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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; ARNICOROXAS, M. 1994. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, 42 (1-2), 29-33.

DE YOUNG, L.M., KHEIFETS, J.B., BALLARON, S.J., YOUNG, J.M. 1989. 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**, 26, 335-341.

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. 1994. Phorbol ester-induced leukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis. **Carcinogenesis**, 15(12), 2823-2827.

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.

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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. 2002. Points of control in inflammation. **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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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. 1998. Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **American Journal of Medicine**, 104 (3A), 2S-8S.

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 anaphylotoxin edema. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**. 112, 174-187,

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

Minicurso 04

Modelos Experimentais de Obesidade – A

Esteatose em Foco

Laboratório de Esteatose Experimental (Bloco I89/sala 03)

Orientadora: Profa. Dra. Emy Luiza Ishii-Iwamoto

Ministrantes: Danielle Aparecida Munhos Hermoso, Eduardo Hideo Gilgioni, Franciele Neves Moreno, Juliana Morais Mewes e Lilian Brites Campos-Shimada

1. INTRODUÇÃO

A obesidade nos últimos anos tornou-se uma epidemia mundial. Modelos animais experimentais que apresentam acúmulo excessivo de gordura corporal têm sido desenvolvidos e utilizados para pesquisas sobre as causas, complicações e alternativas terapêuticas. Para o estudo desta patologia têm-se utilizado modelos de obesidade não genética em roedores visando caracterizar a doença e as demais comorbidades associadas. Esta apostila apresentará bases teóricas sobre a indução da obesidade em animais para pesquisa e suas relações causa-consequências.

1.1. PANORÂMA DA OBESIDADE

A obesidade deixou de ser um problema exclusivo de países ricos e está aumentando dramaticamente, tornando-se um grande problema de saúde pública em todo o mundo (Shamseddeen, H et al., 2011). Países em desenvolvimento também fazem parte desse grande hall que exhibe altos índices de pessoas obesas e/ou com sobrepeso. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência de sobrepeso e obesidade combinados aumentou 27,5% em adultos e 47,1% em crianças de 1980 até 2013. Dados da mesma organização mostram que a obesidade infantil atingia em torno de 31 milhões de crianças em 1990 e atualmente este valor tem aumentado, atingindo em torno de 44 milhões de crianças obesas no mundo. Esta epidemia tem o potencial de anular muitos dos benefícios de saúde que contribuíram para o aumento da expectativa de vida no mundo desenvolvido (WHO, 2015).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Nos países em desenvolvimento o cenário é preocupante. A OMS afirma que a taxa de obesidade nesses países é 30% mais alta que em nações desenvolvidas (WHO, 2015). Uma pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em parceria com o Ministério da Saúde no Brasil mostrou que a obesidade e o excesso de peso têm aumentado rapidamente nos últimos anos, em todas as faixas etárias. A pesquisa revelou que 50% dos homens e 48% das mulheres apresentaram excesso de peso, e a porcentagem de obesos foi de 12,5% nos homens e 16,9% nas mulheres (IBGE, 2010).

Quatro anos depois, um novo levantamento do Ministério da Saúde no Brasil alerta que o excesso de peso já atinge 52,5% da população adulta do país, taxa que, há nove anos, era de 43% - crescimento de 23%. A porcentagem de pessoas obesas (17,9% maiores de 18 anos) é preocupante, pois os quilos a mais na balança são fatores de risco para doenças crônicas, hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer, sendo que estas doenças são responsáveis por 72% dos óbitos no Brasil (MS, 2014).

Devido ao baixo custo e a alta disponibilidade de alimentos altamente calóricos, porém pobres nutricionalmente, não é incomum encontrar obesidade e subnutrição coexistindo em muitos países de baixa e média renda (Ruskovska e Bernlohr, 2013). Além disso, a obesidade está frequentemente associada a uma falta de nutrientes essenciais em subgrupos de baixa renda nos países desenvolvidos (Anderson, 2007; Wiig Dammann e Smith, 2009).

A crescente tendência é a substituição da alimentação tradicional do brasileiro (como arroz, feijão e hortaliças) por uma dieta rica em bebidas e alimentos processados e industrializados. Tal dieta representa um aumento na densidade energética das refeições que induzem a padrões que podem perturbar a autorregulação do balanço energético dos indivíduos e aumentar o risco de obesidade na população (Levy-Costa et al., 2005). Um baixo gasto energético, devido à falta de exercício físico, associado à alta ingestão calórica culmina então no aparecimento da doença, e configura o denominado estilo de vida ocidental contemporâneo (Kac e Velásquez-Meléndez, 2003).

As previsões sugerem que as altas taxas de obesidade afetarão futuramente a saúde e a economia da população (Oliveira, 2013), de maneira que a relação entre as taxas crescentes de obesidade e o aumento dos custos com a saúde torna-se cada vez mais evidente (Finkelstein et al., 2009). Os maiores gastos estão representados pelo tratamento das doenças relacionadas ao sobrepeso e à obesidade, e também incluem os

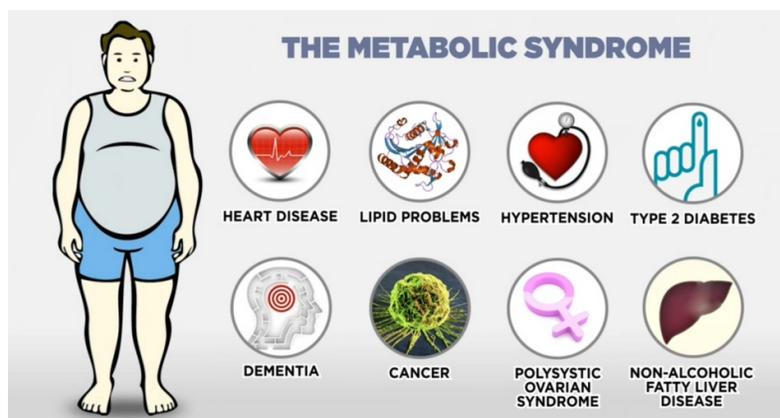
Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

custos indiretos ou sociais, tais como: diminuição da qualidade de vida, problemas de ajustes sociais, perda de produtividade, incapacidade com aposentadorias precoces e morte (Bahia e Araújo, 2014).

Considerando as evidências apresentadas, destaca-se a necessidade de encarar a obesidade como uma doença emergente e uma epidemia que cresce abrangendo grande parte do globo. Isso evidencia a urgência em se propor meios de controle e prevenção. Algumas políticas públicas têm sido propostas para a solução dos problemas, sem, no entanto, grandes retornos positivos até o momento. Desta forma, é extremamente necessária a identificação de alvos terapêuticos que permitam a resolução do problema. O entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes à obesidade e às desordens metabólicas a ela relacionadas pode ser o ponto de partida para novas terapias.

1.2. OBESIDADE E ESTEATOSE HEPÁTICA

Obesidade é uma doença de caráter multifatorial, influenciada tanto por fatores ambientais quanto genéticos (Rupérez et al, 2014). É o elemento central e causal da Síndrome Metabólica (Kahn e Flier, 2000; Spiegelman e Flier, 2001), uma desordem multicomponente caracterizada por hipertrigliceridemia, colesterol HDL baixo, hiperglicemia, obesidade central e hipertensão, que está intimamente ligada às doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2 (Eckel et al., 2005). A obesidade por si só é considerada um fator de risco independente para as doenças crônicas citadas anteriormente (Abbasi et al., 2002). Além disso, tem sido reconhecida também como o principal fator subjacente à patogênese de doenças como resistência à insulina, aterosclerose e dislipidemias, e diferentes formas de câncer (Matsuzawa et al., 1999).



Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Figura 1 - A Síndrome Metabólica. A síndrome metabólica é o nome genérico dado ao conjunto de fatores de risco à saúde - pressão alta, hiperglicemia, níveis elevados de triacilgliceróis, colesterol HDL baixo, LDL colesterol alto e excesso de gordura abdominal.

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal em um nível que compromete a saúde dos indivíduos. Operacionalmente, é diagnosticada por meio do parâmetro estipulado pela OMS - o *body mass index* (BMI) ou *índice de massa corporal* (IMC), calculado a partir da relação entre peso corporal (kg) e estatura (m²) (Who, 1998). De acordo com este parâmetro, indivíduos que apresentam IMC igual ou superior a 30 kg/ m² são considerados obesos (Wanderley e Ferreira, 2010).

IMC	Classificações
Menor do que 18,5	Abaixo do peso normal
18,5 - 24,9	Peso normal
25,0 - 29,9	Excesso de peso
30,0 - 34,9	Obesidade classe I
35,0 - 39,9	Obesidade classe II
Maior ou igual a 40,0	Obesidade classe III

Figura 2 - Tabela do IMC - Índice de Massa Corporal. Classificação segundo a OMS. Obesidade classe III é considerada obesidade mórbida.

O acúmulo de gordura ocorre em vários órgãos e tecidos, incluindo o fígado. Sabe-se que o fígado é o órgão central do metabolismo, o que o torna alvo de estudos básicos (metabolismo primário em geral) e aplicados (doenças metabólicas, por exemplo). O processo de acúmulo excessivo de lipídios no fígado é conhecido como **esteatose**. A esteatose é definida como níveis de triacilgliceróis (TGs) acima de 5% em relação ao volume ou peso do fígado, ou histologicamente, quando 5% ou mais dos hepatócitos apresentarem triacilgliceróis intracelulares (Hoyumpa et al., 1975). A excessiva acumulação de TGs está normalmente associada com alterações no metabolismo de glicose, ácidos graxos livres (FA) e de lipoproteínas.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Na ausência do consumo de quantidades significativas de álcool, o processo é definido como NAFLD - *non-alcoholic fatty liver disease*, ou *doença não-alcoólica do fígado gorduroso*, a manifestação hepática da síndrome metabólica (Rupérez et al, 2014). A NAFLD mais comum é aquela associada com a síndrome metabólica e com resistência à insulina e cuja patogênese é muito pouco conhecida. A NAFLD pode ser também causada por drogas, toxinas ou alterações nas condições nutricionais ou endócrinas do indivíduo (Musso et al., 2009).

Em muitos casos, a NAFLD pode permanecer como uma condição benigna, caracterizada apenas pela esteatose, que pode ser reversível (Moore, 2010). No entanto, o fígado esteatótico pode tornar-se vulnerável a insultos secundários, contribuindo para a progressão da NAFLD para doenças hepáticas mais severas, levando a um processo inflamatório conhecido como NASH (*non-alcoholic steatohepatitis*), que consiste no desenvolvimento de fibrose hepática e, que pode progressivamente, evoluir para cirrose e até mesmo para o carcinoma hepatocelular (Day e James, 1980; Zou et al., 2006).

É evidente que o fígado participa ativamente na patogênese da síndrome metabólica associada à obesidade, pois o aumento de TGs no sangue é devido à superprodução da lipoproteína VLDL pelo fígado. Sugere-se a resistência à insulina poderia modificar a velocidade de síntese e secreção da lipoproteína, o que resultaria no aumento de VLDL (Taghibiglou et al., 2002). Deve-se levar em conta ainda o aumento da lipogênese hepática, aumento dos estoques de TGs hepáticos e de lipoproteínas remanescentes para o acúmulo de lipídios no fígado que caracteriza a esteatose.

Durante o desenvolvimento da obesidade, também ocorre um aumento na quantidade de gordura armazenada no tecido adiposo. Associado a isso, há uma expansão gradual das células adiposas (os adipócitos), que variam seu diâmetro na tentativa de acomodar o excesso de lipídio que está sendo armazenado (Andersson et al., 2007). Apesar de funcional para o armazenamento de lipídios, o aumento no tamanho dos adipócitos leva a maior produção de citocinas pró-inflamatórias bem como a redução na produção de citocinas anti-inflamatórias (Rotter et al., 2003). Portanto, a expansão do tecido adiposo que ocorre com a obesidade tem sido associada com hipóxia, estresse oxidativo e até mesmo danos mecânicos devido à hipertrofia dos adipócitos (Kahn et al., 2006), alterações estas que levam, por conseguinte, ao estado pró-oxidativo e pró-inflamatório característico de pacientes com a síndrome metabólica (Kahn et al., 2006).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Vale destacar que citocinas relacionadas à obesidade, como interleucina-6 (IL-6), adiponectina, leptina e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), desempenham um importante papel no desenvolvimento da NAFLD (Başaranoğlu e Ormeci, 2014), e o tecido adiposo é hoje reconhecido como uma fonte importante de mediadores inflamatórios e adipocinas, tanto pró-inflamatórias como anti-inflamatórias (Browning e Horton, 2004; Yang et al., 1997).

1.3. MODELOS ANIMAIS DE ESTEATOSE EXPERIMENTAL

Existem vários modelos experimentais para o estudo da esteatose e obesidade. Um dos modelos implantados no Laboratório de Esteatose Experimental é o induzido por uma dieta desbalanceada hipercalórica (dieta de cafeteria). A dieta é baseada na oferta de alimentos saborosos e atrativos ao paladar humano como chocolates, bolachas, queijo, embutidos e refrigerantes. Este tipo de dieta é capaz de promover todas as características da síndrome metabólica: acúmulo excessivo de gordura corporal, aumento da taxa de esterificação/oxidação de ácidos graxos livres no fígado de ratos com deposição de triacilgliceróis no órgão e secreção aumentada de lipoproteínas (VLDL), aumento dos níveis séricos de insulina e resistência à insulina, hiperglicemia, aumento de peroxidação lipídica no fígado e alterações dos níveis de leptina e adipocitocinas (Milagro et al., 2006; Abraldes et al., 2010).

A esteatose associada à deficiência estrogênica, por outro lado, é bem menos estudada. Com o aumento da expectativa de vida, as mulheres passaram a viver um terço de suas vidas na pós-menopausa. A deficiência estrogênica existente nesta fase traz sérios problemas de saúde, por desencadear uma série de doenças graves. Além de alterações sobre o esqueleto (osteoporose) e o sistema cardiovascular, a deficiência estrogênica produz também profundas alterações no metabolismo lipídico, aumentando o risco de dislipidemias; com isto, a incidência de doenças cardiovasculares, principalmente as coronariopatias, também aumenta. Além disso, mulheres na pós-menopausa exibem uma crescente tendência à obesidade: há uma progressiva redução da massa corporal magra e aumento da massa gordurosa, hoje sabidamente decorrente da depleção hormonal. Ao mesmo tempo, o padrão de distribuição da gordura corporal modifica-se, passando do típico padrão feminino (ginóide) modulado pelos estrogênios, para uma distribuição andróide, caracterizada pela deposição de gorduras na área visceral, com aumento da relação cintura-quadril. O tipo de distribuição andróide parece

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

relacionar-se a uma maior morbimortalidade cardiovascular, diabetes e a hiperinsulinemia (Ley e cols., 1992).

Ratas ovariectomizadas (retirada dos ovários) são utilizadas como modelo de obesidade/esteatose associado como climatério. As ratas ovariectomizadas apresentam algumas alterações típicas de síndrome metabólica, como aumento do nível plasmático de insulina (Ley et al., 1992; Liu et al., 2004) e acúmulo de TGs no fígado (esteatose) associado com redução na expressão do PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor α) e aumento da transcrição da SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein) e da SCD-1 (stearoyls coenzyme A desaturase) (Paquette et al., 2008).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do mini-curso é contribuir para o conhecimento da patogênese da esteatose, avaliando parâmetros físicos e bioquímicos que permitem caracterizar alterações no sangue, no tecido adiposo branco e especialmente no fígado, que se assemelham as alterações encontradas na obesidade em humanos.

3. ROTEIRO DOS EXPERIMENTOS

Roteiro dos experimentos

Os animais serão eutanasiados com tiopental sódico (50mg/kg), em seguida, o sangue será coletado por punção cardíaca para realização das análises bioquímicas do soro e plasma.

Análises bioquímicas do soro e plasma

O colesterol total, colesterol-HDL (lipoproteína de alta densidade), triacilgliceróis (TG) e de glicose no plasma serão avaliados por métodos convencionais, utilizando kits de ensaio (Gold Analisa®). Os níveis de colesterol-VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) serão calculados utilizando-se a equação de Friedewald (Friedewald, Levy e Fredrickson, 1972), e os níveis de colesterol-LDL (lipoproteína de baixa densidade) serão determinados subtraindo-se os valores de HDL e VLDL-colesterol a partir dos níveis de colesterol total.

Após a coleta de sangue, amostras de fígado serão removidas e fixadas em nitrogênio líquido para dosagens subsequentes do teor de lipídios.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Determinação do conteúdo hepático de lipídios

O teor de lipídios total do fígado será determinado utilizando-se método gravimétrico (Folch et al., 1957). A extração de lipídios será realizada através da homogeneização de 0,5 gramas de fígado em uma mistura de clorofórmio-metanol gelado (2:1 v.v). Os resultados serão expressos como g de gordura total por 100 g de peso úmido do fígado. Os níveis de colesterol total e de triacilgliceróis hepáticos serão determinados após a ressuspensão de gordura extraída e seca, utilizando kits de ensaio específicos (Gold Analisa®).

Índice de adiposidade

Depósitos de gordura: retroperitoneal, uterina, mesentérica e inguinal serão retiradas e pesadas. Os resultados serão expressos em g/100 g do peso corporal. O índice de adiposidade será definido como a razão entre a soma dos pesos destes depósitos por 100 g do peso corporal (Campos et al., 2012). Para confirmar o sucesso da OVX, o útero também será coletado e pesado e, expresso em g por 100 g do peso corporal.

3.1. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Eutanásia dos animais

Tiopental

O Tiopental é o único barbitúrico de ultracurta duração que é universalmente disponível. É necessária uma dose, no mínimo, três vezes maior que a indutora de plano anestésico, quando se requer a eutanásia. Assim, essa dose elevada garante que ocorra inicialmente anestesia (de 15 a 30 segundos) e depois, a morte; não manifestando, em nenhuma dessas fases, excitação. Vale ressaltar que o tiopental, quando aplicado lentamente, é redistribuído em outros órgãos que não o cérebro, impedindo assim a ocorrência da morte.

Coleta de sangue

Punção cardíaca

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Normalmente utilizada para obtenção de grandes volumes de sangue. É uma coleta final, pois o animal normalmente é sacrificado após este tipo de procedimento. Após a anestesia, o animal deve ser colocado em uma superfície plana, em decúbito dorsal e a agulha inserida lateralmente ao processo xifoide. Dependendo da espécie, outros sítios anatômicos podem ser utilizados como: veia safena, veia jugular, veia femoral, veia peniana, veia cefálica e a veia sublingual.

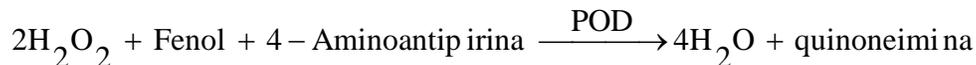
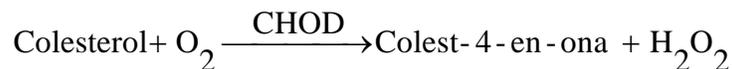
Análises bioquímicas do soro e plasma

COLESTEROL TOTAL

Fundamentos

Os ésteres do colesterol são hidrolisados pela enzima colesterol esterase (CHE) formando colesterol livre. O colesterol formado será oxidado pela enzima colesterol oxidase (CHOD) formando peróxido de hidrogênio. Este último irá reagir com o fenol e 4-aminoantipirina, em uma reação catalisada pela peroxidase (POD), produzindo ao final uma quinoneimina de cor vermelha.

A absorvância do complexo formado, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.



Aplicação clínica

A dosagem do colesterol no sangue, juntamente com a de triacilgliceróis e de colesterol HDL, é empregada principalmente na avaliação de risco de doença arterial coronariana e no monitoramento de pacientes com hipotireoidismo, diabéticos e obesos.

Coleta das amostras

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

A amostra de sangue deve ser colhida após um jejum de 12 horas para evitar a interferência da lipemia pós-prandial que geralmente está presente em amostras obtidas sem jejum.

Equipamentos

- Espectrofotômetro (leitura entre 490 e 510 nm);
- Tubos e Pipetas;
- Banho-Maria a 37°C;
- Cronômetro.

Procedimento Manual

Condições do Teste

Leitura: Comprimento de onda 500 nm

Medida: Contra o Branco

Técnica de Análise

1-Identificar 3 tubos de ensaio com “Branco”, “Teste” e “Padrão” e proceder:

Tubos	Branco	Teste	Padrão
Soro	-----	10 µL	-----
Padrão	-----	-----	10 µL
Reagente de Cor	1000 µL	1000 µL	1000 µL

2- Homogeneizar e incubar em banho-maria a 37°C por 10 minutos.

O nível de água do banho-maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos.

3- Fazer as leituras fotométricas do Padrão (AP) e do Teste (AT), zerando o aparelho com o Branco em 500 nm (490 a 510 nm).

A cor é estável durante 1 hora.

Cálculos

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Observar a linearidade

Como a metodologia obedece a lei de Lambert- Beer, calcular a concentração do teste através do Fator de Calibração (FC).

CP = Concentração do Padrão = 200 mg/dL

AP = Absorbância do Padrão

CT = Concentração do Teste

AT = Absorbância do Teste

FC = CP ÷ AP

CT (mg/dL) = FC × AT

Exemplo

Se CP = 200 mg/dL

AP = 0,347

AT = 0,301

FC = CP ÷ AP = 200 ÷ 0,347 = 576

CT (mg/dL) = FC × AT = 576 × 0,301 = 173 mg/dL

Resultados

Unidades Convencionais (mg/dL) × 0,026 = Unidades SI (mmol/L).

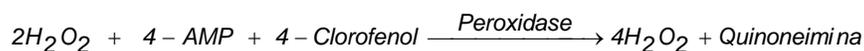
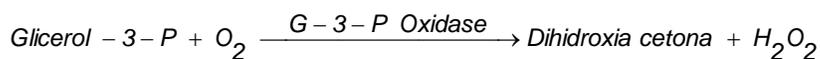
TRIACILGLICEROL

Princípio do Teste

Os triacilgliceróis são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e o glicerol liberado é fosforilado pela glicerolquinase formando glicerolfosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através de reação de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase, a água oxigenada reage com o a 4-aminoantipirina (4-AMP) e 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina (vermelha) cuja absorbância, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de triglicérides.



Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015



Aplicação Clínica

A dosagem de triacilglicerol no sangue, juntamente com o colesterol total e suas frações, é empregada principalmente na avaliação dos riscos de Doença Arterial Coronariana (DAC).

Coleta das amostras

Colher sangue pela manhã após jejum obrigatório de 12 horas.

Equipamentos

- Espectrofotômetro (leitura entre 490 e 510 nm);
- Tubos e Pipetas;
- Temperatura: ambiente (15-30°C) ou a 37°C;
- Cronômetro.

Procedimento

1- Deixar os reagentes atingirem a temperatura ambiente ou a do banho-maria antes da utilização.

2- Identificar 3 tubos de ensaio com "Branco", "Teste" e "Padrão" e pipetar:

Tubos	Branco	Teste	Padrão
Amostra	—	10 µL	—
Padrão	—	—	10 µL
Reagente de Cor	1000 µL	1000 µL	1000 µL

3- Agitar bem e incubar os tubos durante 15 minutos à temperatura ambiente ou por 5 minutos a 37° C.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

4- Ler a absorbância (A) do Padrão (Ap) e do Teste (At), zerando o aparelho com o Branco em 500 nm.

5- A cor é estável por 2 horas.

Resultados

Unidade de Medida (mg/dL)

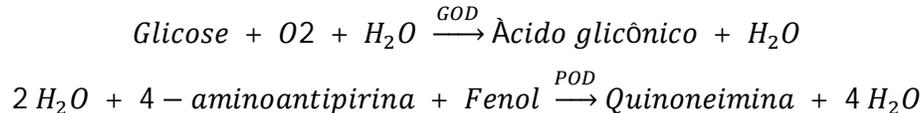
Fator de Conversão de Unidades (mg/dL para SI)

mg/dL de Triglicérides x 0,0113 = mmol/L de Triglicérides

GLICOSE

Princípio do Teste

A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorbância medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.



Aplicação Clínica

A dosagem da Glicose no sangue é empregada na avaliação do metabolismo da glicose (controle de produção, consumo e armazenamento), diagnosticando os diversos estados de hiper e hipoglicemias.

Coleta das Amostras

Colher sangue pela manhã após jejum 8 horas

Procedimento

Condições do Teste

Leitura: Comprimento de onda 505 nm

Medida: Contra o Branco

Técnica de Análise

1- Identificar 3 tubos de ensaio com "Branco", "Teste" e "Padrão":

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Tubos	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	-----	10 µL	-----
Padrão	-----	-----	10 µL
Reagente de Cor	1000 µL	1000 µL	1000 µL

2- Homogeneizar e incubar os tubos em banho-maria a 37°C por 10 minutos. O nível de água do banho-maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos.

3- Ler a absorbância do Padrão (AP) e do Teste (AT), zerando o aparelho com o Branco em 505 nm (490 a 510 nm).

A cor é estável durante 30 minutos.

Resultados

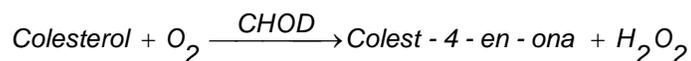
Fator de Conversão de Unidades (mg/dL para SI)

mmol/L de Glicose = mg/dL de Glicose × 0,0555

COLESTEROL HDL

Fundamentos

Os quilomícrons, as lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) e as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são quantitativamente precipitadas com fosfotungstato e íons magnésio. Após centrifugação, o sobrenadante contém as lipoproteínas de elevada densidade (HDL), cujo colesterol é quantificado fotometricamente mediante as reações acopladas descritas abaixo. A absorbância do complexo formado (vermelho), medida em 500 nm, é diretamente proporcional á concentração de colesterol HDL da amostra.



Aplicação Clínica

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

A dosagem do Colesterol HDL no sangue, juntamente com a de triacilglicerol e de colesterol total, é empregada principalmente na avaliação de risco de doença arterial coronariana.

Coleta das Amostras

A amostra de sangue deve ser colhida após jejum de 12 horas para evitar a interferência da lipemia pós-prandial que geralmente está presente em amostras obtidas sem jejum.

Equipamentos

- Espectrofotômetro (leitura entre 490 a 540 nm);
- Centrífuga;
- Banho-Maria;
- Tubos e Pipetas;
- Cronômetro.

Condições da Reação

Leitura: Comprimento de onda 500 nm

Medida: Contra o Branco

Técnica de Análise

Precipitação das frações VLDL e LDL

1-Em microtubo de centrífuga pipetar:

Amostra	250 μ L
Precipitante	50 μ L

2-Agitar fortemente por 30 segundos.

3-Centrifugar a 3500 rpm durante 15 minutos para obter um sobrenadante límpido.

4- Pipetar o sobrenadante límpido, imediatamente após a centrifugação, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado para evitar resultados falsamente elevados.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Ver notas acima.

Colorimetria

1-Identificar 3 tubos de ensaio e pipetar:

Tubos	Branco	Teste	Padrão
Sobrenadante	-----	100 μ L	-----
Padrão	-----	-----	100 μ L
Reagente de Cor (Cat. 460)	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L

2-Homogeneizar e incubar em banho-maria a 37°C por 10 minutos.

O nível da água o banho-maria deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos.

3-Fazer as leituras fotométricas do Padrão (AP) e do Teste (AT) em 500 nm, zerando o aparelho com o Branco.

A cor é estável durante 60 minutos.

Cálculos

CP = 40mg/dL = Concentração Equivalente indicada no rótulo do frasco.

CT = Concentração do Teste

AP = Absorbância do Padrão

AT = Absorbância do Teste

FC = CP \div AP

CT (mg/dL) = FC \times AT

Exemplo

CP = 40 mg/dL

Se AP = 0,320

Se AT = 0,394

FC = CP \div AP = 40 \div 0,320 = 125

CT = FC \times AT = 125 \times 0,394 = 49 mg/dL

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Cálculo da Concentração do Colesterol VLDL e LDL

A concentração do Colesterol VLDL e LDL pode ser calculada através da equação de Friedewald, que é muito exata para amostras cujos valores de triglicérides não ultrapassem 400 mg/dL e não pertençam a pacientes portadores de lipoproteínemia do tipo III.

Equação de Friedewald

Colesterol LDL = Colesterol Total – (HDL + VLDL)

Colesterol VLDL = Triglicérides ÷ 5

Resultados

Fator de Conversão de Unidades

Unidades convencionais (mg/dL) × 0,026 = Unidades SI (mmol/L)

Determinação do conteúdo hepático de lipídios

Extração de Lipídios do Fígado

A extração de lipídios será feita por gravimetria, usando solventes orgânicos clorofórmio e metanol. Os detalhes do procedimento serão informados durante os experimentos.

Dosagens de Triacilglicerol e Colesterol Total dos Lipídios Extraídos.

Reagentes do kit GoldAnalisa:

Procedimento

1. Adicionar 10 µL da gordura resuspendida aos tubos;
2. Adicionar 1000 µL do reagente de cor do kit de TG ou de colesterol total;
3. Aguardar 10 min a 37°C;
4. Ler em espectrofotômetro em 500 nm.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

1. Anderson, A.S. Nutrition interventions in women in low-income groups in the UK. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 66, n. 01, p. 25-32, 2007.
2. Abbasi, F.; Brown Jr, B.W.; Lamendola, C.; Mclaughlin, T.; Reaven, G.M. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 40, n. 5, p. 937-943, 2002.
3. Bahia, L.; Araújo, D. V. Impacto econômico da obesidade no Brasil. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 13, n. 1, 2014.
4. Başaranoğlu, M.; Ormeci, N. Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnosis, pathogenesis, and management. *The Turkish journal of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology*, v. 25, n. 4, p. 127-132, 2014.
5. Browning, J.D.; Horton, J.D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *Journal of Clinical Investigation*, v. 114, n. 2, p. 147-152, 2004.
6. Campos, L. B; Gilglioni, E. H; Garcia, R. F; Brito, M. N; Natali, M.R; Ishii-Iwamoto, E.L, et al. Cimicifuga racemosa impairs fatty acid β -oxidation and induces oxidative stress in livers of ovariectomized rats with renovascular hypertension. *Free Radical. Bio. Med.* 15. 680-689, 2012.
7. Day, C.P.; James, O.F.W. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.
8. Eckel, R. H.; Grundy, S. M.; Zimmet, P. Z. The metabolic syndrome. *The Lancet*, v. 365, n. 9468, p. 1415-1428, 2005.
9. Finkelstein, E.A.; Fiebelkorn, I.C.; Wang, G. National medical spending attributable to overweight and obesity: how much, and who's paying? *Health Affairs-Millwood Va Then Bethesda*, v. 22, n. 3; SUPP, p. W3-219, 2003.
10. Folch, J; Lees, M; Sloane-Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226. 497-509, 1957.
11. Friedewald, W. T; Levy, R.I; Fredrickson, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18 (6). 499-502, 1972.
12. Hoyumpa, A.M. Jr.; Greene, H.L.; Dunn, G.D.; Schenker, S. Fatt liver: biochemical and clinical considerations. *Am J Dig Dis*, 20:1142-1170, 1975.
13. IBGE. Um Panorama da saúde no Brasil - Acesso e Utilização dos Serviços, Condições de Saúde e Fatores de Risco e Proteção à Saúde. In: Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios. Rio de Janeiro, 2010. 245 p. Disponível em:

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

- <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/panorama_saude_brasil_2003_2008/PNAD_2008_saude.pdf>. Acesso em: jun. 2015.
14. Kac, G.; Velásquez-Meléndez, G. A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. *Cad Saúde Pública*, v. 19, n. 1, p. 4-5, 2003.
 15. Kahn, S.E.; Hull, R.L.; Utzschneider, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, v. 444, n. 7121, p. 840-846, 2006.
 16. Kahn, B.B.; Flier, J.S. Obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, v. 106, n. 4, p. 473-481, 2000.
 17. Levy-Costa, R.B.; Sichieri, R.; Pontes, N.S.; Monteiro, C.A.; Monteiro, C. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). *Revista de Saúde Pública*, v. 39, n.4,p. 530-40, 2005.
 18. MS. Vigilância de Fatores de Risco de Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasil, 2014. 37 p. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/15/PPT-Vigitel-2014-.pdf>>. Acesso em: jun. 2015.
 19. Matsuzawa, Y.; Funahashi, T.; Nakamura, T. Molecular Mechanism of Metabolic Syndrome X: Contribution of Adipocytokines· Adipocyte-derived Bioactive Substances. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 892, n. 1, p. 146-154, 1999.
 20. Moore, J.B. Non-alcoholic fatty liver disease: the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 69, n.02, p.211-220, 2010.
 21. Musso, G.; Gambino, R.; Cassader, M. Etiology and Pathophysiology. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. *Obesity Reviews*, 1-16, 2009.
 22. Oliveira, M. L. *Estimativa dos custos da obesidade para o Sistema Único de Saúde do Brasil*. 2013. Tese (doutorado).
 23. Ruskovska, T.; Bernlohr, D. A. Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue—implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *Journal of proteomics*, v. 92, p. 323-334, 2013.
 24. Rupérez, A.I.; Gil, A.; Aguilera, C.M. Genetics of Oxidative Stress in Obesity. *International journal of molecular sciences*, v. 15, n. 2, p. 3118-3144, 2014.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

25. Rotter, V.; Nagaev, I.; Smith, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 46, p. 45777-45784, 2003.
26. Shamseddeen, H.; Getty, J.Z.; Hamdallah, I.N.; Ali, M.R. Epidemiology and economic impact of obesity and type 2 diabetes. *Surgical Clinics of North America*, v. 91, n. 6, p. 1163-1172, 2011.
27. Spiegelman, B.M.; Flier, J.S. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, v. 104, n. 4, p. 531-543, 2001.
28. Taghibiglou, C.; Van Inderstine, S.; Chen, B.; Carpentier, A; Lwis, G.F.; Adeli, K. Hepatic VLDL overproduction and reduced apo B degradation in an animal model of insulin resistance, the fructose-fed hamnster, is associated with suppression of intracellular levels of ER-60 portease. *Circulation*102:II-88 (Abstract 423), 2000.
29. WHO. Interim Report of the Commission on Ending Childhood Obesity. Switzerland, 2015. 30 p. Disponível em: < <http://www.who.int/end-childhood-obesity/commission-ending-childhood-obesity-interim-report.pdf?ua=1>>. Acesso em: jun. 2015.
30. Wiig Dammann, K.; Smith, C. Factors affecting low-income women's food choices and the perceived impact of dietary intake and socioeconomic status on their health and weight. *Journal of nutrition education and behavior*, v. 41, n. 4, p. 242-253, 2009.
31. World Health Organization. *Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity*. Geneva: WHO; 1998.
32. Wanderley, E. N.; Ferreira, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. *Cien Saude Colet*, v. 15, n. 1, 2010.
33. Yang, S.Q.; Lin, H. Z.; Lane, M.D.; Clemens, M., Diehl, A.M. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 6, p. 2557-2562, 1997.
34. Zou, Y.; Li, J.; Lu, C., Wang, J., Ge, J., Huang, Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life sciences*, v. 79, n. 11, p. 1100-1107, 2006.

Minicurso 05

A Mitocôndria Vegetal como Sítio de Ação de Potenciais Bioherbicidas

Laboratório de Oxidações Biológicas (Bloco I89/sala 03)

Orientadora: Profa. Dra. Emy Luiza Ishii-Iwamoto

Ministrantes: Ana Luiza Santos Wagner, Gislaine Cristiane Mantovanelli e Márcio Shigueaki Mito

INTRODUÇÃO

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 diferencial.

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 contém 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*, da palavra grega que significa filamentos de cartilagem. Ele e nenhum outro cientista daquela época deram às mitocôndrias a devida importância, o que se sabia apenas que elas existiam e que faziam parte da 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 acreditavam que as mitocôndrias eram 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 uma grande quantidade de ATP para as células. Uma mitocôndria é limitada por duas membranas concêntricas que delimitam o espaço interno (a matriz) e a membrana interna que a circunda. A matriz mitocondrial contém uma grande variedade de enzimas, incluindo aquelas que convertem piruvato e ácidos graxos em acetil-CoA e

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

aquelas que oxidam Acetil-CoA em CO₂ através do ciclo do ácido cítrico. Essas reações de oxidação produzem grandes quantidades de NADH (e de FADH₂).

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

As mitocôndrias de tecidos animais medem de 0,7 a 1,0 micrometros 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 interna 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 um carreador específico.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 do 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 O₂. Cada um desses complexos é capaz de bombear H⁺ quando os eletros são transportados através deles. Nestes complexos os eletros 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 → complexo da NADH-desidrogenase → ubiquinona → complexo do citocromo *b-c*₁ → citocromo *c* → complexo da citocromo oxidase → oxigênio molecular (O₂).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

Inibidores e desacopladores

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 Pi 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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

mesmo quando a síntese de ATP está inibida. Na década de 1920 o DNP foi usado como “pílula dietética”, uma prática 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, substâncias que exerçam uma ação inibitória sobre as funções mitocondriais de vegetais têm, a princípio, um potencial herbicida e podem ser consideradas no desenvolvimento de novos produtos para o controle de plantas daninhas. Muitas destas substâncias podem provocar ruptura da membrana mitocondrial ou ainda inibir a função mitocondrial através de diferentes mecanismos. As drogas podem sequestrar coenzima A ou podem inibir a transferência de elétrons ao longo da cadeia respiratória, ou a ATP-sintase. Alguns compostos 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 composto tem 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.

As estrobilurinas fazem parte de um grupo de fungicidas cuja toxicidade advém da inibição da cadeia respiratória ao nível do complexo III. Este composto natural inibe o transporte de elétrons entre o citocromo *b* e o citocromo *c* da cadeia transportadora de elétrons, causando diminuição da oxidação do NADH e da produção de ATP. Como consequência, a produção de energia é parada e o fungo morre. Além da inibição do Complexo III, esse grupo de fungicidas pode inibir o Complexo II, interromper a fosforilação oxidativa ou inibir a atividade da ATPsintase

As oxatinas (carboxina - $C_{12}H_{13}NO_2S$), utilizadas principalmente no controle de basidiomicetos, atuam na respiração mitocondrial inibindo a succinato desidrogenase, e assim interfere na transferência de elétrons do succinato para a quinona. A resistência às oxatinas é conferida por mutações nos genes de três subunidades da succinato desidrogenase (Shima et al, 2011).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 as variações na concentração de oxigênio em um meio contendo mitocôndrias ou partículas mitocondriais em suspensão. O que tornou isso possível foi 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 termostaticada (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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 25°C a solubilidade é de 240µM. 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 vegetais

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

Além disso, 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 (AOX) (Insensível ao cianeto), cujo papel fisiológico não está bem estabelecido, mas com evidências que esteja associada à produção de calor para realização de diversos eventos no organismo vegetal: amadurecimento e senescência dos frutos, germinação de sementes, exalação de produtos voláteis etc. A oxidase alternativa pode também contribuir para a respiração mitocondrial, mas a sua proporção relativa é variável dependendo do órgão da planta, da espécie e mesmo das condições metabólicas da planta (Moor e Siedow, 1991; Popov et al., 1997). Outras condições associadas a estresses bióticos e abióticos foram estudadas, e mostraram-se eficientes em afetar a expressão e/ou a atividade da AOX (Vanlerberghe e McIntosh, 1997).

Existem também as oxidases extramitocondriais, representadas por enzimas do sistema monooxigenase, lipoxigenases, NADPH oxidases, etc (Bendall e Bonner, 1971; Parrish e Leopold, 1978) que também contribuem para o consumo de oxigênio celular.

A contribuição da citocromo-oxidase (COX) pode ser facilmente avaliada através da utilização de cianeto de potássio (KCN) que inibi a COX. A respiração KCN-sensível representa a contribuição da via COX para respiração total e a respiração KCN-insensível representa a contribuição da via AOX mais as oxidases extramitocondriais (Ishii-Iwamoto et al., 2006).

A oxidase alternativa é inibida especificamente por agentes complexantes de ferro, como ácido hidroxâmico substituído (ácido salicilhidroxâmico – SHAM, ácido benzil hidroxâmico – BHAM ou n-propil galato) (Vanlerberghe e McIntosh, 1997), tiocianato de potássio, 8-hidroxilamina e α, α' -dipiridila (Ikuma, 1972).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos de germinação, respiração e extração de mitocôndria serão realizados no Laboratório de Oxidações Biológicas da Universidade Estadual de Maringá – PR.

Isolamento e atividade respiratória de mitocôndria vegetal

Material biológico

As sementes de *Glycine max* foram compradas comercialmente.

Isolamento de mitocôndria vegetal

O isolamento das mitocôndrias será realizado a partir de raízes primárias de *Glycine max* crescidas por 96 horas após a semeadura em folha tripla de papel germitest configurados em rolos, acondicionados em tubos e mantidos em câmara de germinação, com temperatura constante de 25 °C no escuro.

As raízes das plântulas serão lavadas em água destilada, suas raízes primárias seccionada em segmentos de 1 cm e então colocadas em 200 ml de meio de extração. Em seguida, serão picotadas com tesoura, e em seguida, trituradas no mixer. O material triturado obtido será filtrado em gaze e o pH será acertado para 7,2 com adição de KOH e então centrifugado a 3.500 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante contendo as mitocôndrias será centrifugado novamente a 14.000 rpm por 10 minutos.

Após a centrifugação retirar a camada de gordura que fica na superfície do sobrenadante. O sobrenadante será desprezado e com um pincel suspender o precipitado adicionando 0,5 ml do meio de lavagem no primeiro tubo. A suspensão (precipitado + meio de lavagem) será transferida do primeiro tubo para tubo seguinte com o auxílio de uma pipeta, assim consecutivamente. Outros 0,5 ml de meio de lavagem serão utilizados para lavar os tubos. A suspensão (precipitado + meio de lavagem) será utilizada como fonte de mitocôndria. As mitocôndrias deverão ser mantidas em banho de gelo para a realização dos testes.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Meio de extração		
Solução estoque	Volume a ser adicionado (ml)	Concentração final (mM)
Manitol 0,5 M	160	0,4 M
Tris 1,0 M, pH 7,4	10	50 mM
EDTA 1,0 M	2	1,0 mM
MgCl 1,0 M	0,2	1 mM
Cisteína	0,2 g	1,0 mg/ml
Albumina bovina livre de ácidos graxos	1,0 g	5,0 mg/ml

Obs.: Adicionar a cisteína ao manitol e esperar dissolver. Somente após a dissolução os demais reagentes (exceto a albumina) deverão ser acrescentados. Completar com água destilada até o volume final de 200 ml, acertar o pH para 7,2 (HCl ou KOH), acrescentar a albumina e deixar gelar.

Meio de suspensão		
Solução estoque	Volume a ser adicionado (ml)	Concentração final (mM)
Manitol 0,5 M	3	0,3 M
EDTA 1,0 M	50 µL	1,0 mM
Hepes 0,5 M	200 µL	20 mM
Albumina bovina livre de ácidos graxos	0,01 g	2,0 mg/ml

Completar com água destilada até o volume final de 5 ml, acertar o pH para 7,2 (HCl ou KOH) e acrescentar a albumina.

Determinação da atividade respiratória de mitocôndrias de *Glycini max*

O consumo de oxigênio das mitocôndrias isoladas será medido polarograficamente, a 25°C. O meio de reação será adicionado à câmara de acrílico e é composto de:

Meio de reação		
Reagente	Volume para 150 ml	Concentração final
Manitol 0,5 M	120 ml	0,4 M
Tris 1,0 M	1,5 ml	10 mM
KH ₂ PO ₄ 5,0 mM	7,5 ml	5,0 mM
MgCl ₂ 1,0 M	0,75 ml	5,0 mM
Albumina bovina livre de ácidos	1,5 g	10,0 mg/ml

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

graxos

Completar com água destilada até o volume final de 150 ml, acertar o pH para 7,2 (HCL ou KOH) e acrescentar albumina. Deixar gelar.

Será adicionado quantidades de mitocôndria de modo a se obter de 1,4 a 1,6 mg de proteína mitocondrial. O conteúdo de proteína será dosado de acordo com Bradford, 1976 da seguinte forma: três tubos serão separados para a amostra, três tubos para o padrão e três tubos para o branco. Colocar 100 μL de amostra nos tubos de amostra, 50 μL de padrão de albumina padrão 20% e 50 μL de água destilada nos tubos do padrão e 100 μL de água destilada nos tubos de branco. Nos tubos da amostra, do padrão e do branco adicionar 1000 μL do reativo de Bradford. Esperar 5 min e ler a absorbância em 595 nm.

As avaliações relacionadas ao consumo de oxigênio iniciarão pela adição de Malato 0,5 M + NAD⁺ 50 mM ou NADH 5,0 mM. A respiração basal é representada pelo consumo de oxigênio dos primeiros 5 minutos aproximadamente. ADP 50 mM 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 80 mM e SHAM 1 M.

Avaliações da velocidade de consumo de oxigênio, controle respiratório (RC) e razão ADP/O

a) Velocidade de consumo de oxigênio:

A velocidade da respiração deve ser calculada em nmol de oxigênio consumido por minuto por miligrama de proteína (nmoles.min⁻¹.mg⁻¹), considere a solubilidade do oxigênio no ar como sendo igual a 240 μM a 25°C. A velocidade (V) é igual a divisão do consumo de oxigênio (cm) pela velocidade do papel (cm/min) que no caso é $X = \text{cm} / 2 \text{ min}$ (Velocidade do papel = 1 cm / 2 min).

G (cm) -----240 x 10⁻⁶ M

V (cm)-----x M

x M

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

x nº de moles -----1L

y -----2 x 10⁻³ L ⇒ volume de incubação (2 ml)

x moles/min.mg de proteína-1 (dividir pela mg de proteína adicionada)

= nmoles. min⁻¹.mg⁻¹

Calculo do fator

$[(240 \times 2)/G(\text{cm})]/\text{mg de proteína}$

O fator já sai em nmoles. min⁻¹.mg⁻¹, portanto, para obter a velocidade de consumo de oxigênio multiplica-se a distancia medida no estado II, III e IV pelo fator e o resultado será expresso em nmoles. min⁻¹.mg⁻¹

b) Determinação do controle respiratório (RC):

RC é o indicador do controle da fosforilação

O coeficiente de controle respiratório (RC) é calculado pela seguinte relação:

RC = velocidade de consumo O₂ no estado III

velocidade de consumo O₂ no estado IV

O consumo de O₂ no estado III é definido como a respiração durante a fosforilação do ADP adicionado; o consumo de O₂ no estado IV é a respiração após o ADP adicionado ter sido consumido.

c) Determinação da razão ADP/O:

Razão ADP/O é a estequiometria entre o número de moléculas de ADP fosforiladas por átomo de oxigênio consumido.

Razão ADP/O = $\frac{\text{ADP adicionado}}{\text{consumo extra de O}_2 \text{ durante o estado III}}$.

Razão ADP/O - É indicador da integridade da membrana, desta forma pode-se verificar se os prótons retornam apenas pela ATPase.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Para isto será necessário calcular o nº de moles de ADP adicionado:

nº de moles = M x V (L), sendo que foram adicionados 5×10^{-6} L de uma solução de ADP com concentração de 50×10^{-3} M.

Portanto:

$$\text{nº de moles} = (50 \times 10^{-3}) \times (5 \times 10^{-6})$$

$$\text{nº de moles} = 2,5 \times 10^{-7}$$

Consumo extra de O₂ durante o estado III

G (cm) ----- 240×10^{-6} M

Distancia entre Est. III e Est. IV (cm)-----x M

x M

x nº de moles -----1L

y ----- 2×10^{-3} L \Rightarrow volume de incubação (2 ml)

$$\text{nº de moles} = y \text{ moles (x2)} \Rightarrow \text{átomos de O}$$

$$\text{nº de átomos-grama} = Y$$

Sendo assim: Razão ADP/O = $2,5 \times 10^{-7} / Y$

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.C. Biologia molecular da célula. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

BENDALL, D.S.; BONNER, W.D. Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria. Plant Physiol. 47:236-245, 1971.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L. 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, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-254, 1976.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R.A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*. 175: 1120-1121, 1955.

IKUMA, H. Electron transport in plant respiration. *Ann Rev Plant Physiol*. 23: 419-36, 1972.

ISHII-IWAMOTO, E.L.; ABRAHIM, D.; SERT, M.A.; BONATO, C.M.; KELMER-BRACHT, A.M.; BRACHT, A. Mitochondria as a site of allelochemical action, pp. 267-284, in: M. J. Reigosa, N. Pedrol e L. González (eds.) *Allelopathy: A physiological process with ecological implications*. (Org) Springer Science, Netherlands, 2006.

MOOR, A.L; SIEDOW, J.N.The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1059:121-140, 1991.

PARRISH, D.J.; LEOPOLD, A.C.On the mechanism of aging in soybean seeds. *J Plant Physiol*. 61:365-368, 1978.

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*. 44:3 4-87, 2012.

POPOV, V.N.; SIMONIAH, R.A.; SKULACHEV, V.P.; STARKOV, A.A. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria, *FEBS Lett*. 415:87-90, 1997.

SHIMA, Y.; ITO, Y.; HATABAYASHI, H.; KOMA, A.; YABE, K. Five carboxin-resistant mutants exhibited various responses to carboxin and related fungicides. *Bioscience Technol Biochem*. 75:181-184, 2011.

VANLERBERGHE, G.C.; McINTOSH, L. Alternative oxidase. *Annu Ver Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48:703-734, 1997.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular. 2^a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

Minicurso 06

Estudo das Técnicas de Perfusão Hepática e de Estresse Oxidativo em Fígado de Ratos

Laboratório de Metabolismo Hepático (Bloco I89/sala 01)

Orientador: Prof. Dr. Jurandir Fernando Comar

Ministrantes: Anacharis B. de Sá Nakanishi, Andreia Assunção Soares, Cristiane Vizioli de Castro Ghizoni, Gabriela Bueno Franco Salla, Geferson de Almeida Gonçalves, Gisele Adriana Bubna Juliany, Fontoura da Silva Pereira e Mariana Marques Nogueira Wendt

1. INTRODUÇÃO

O fígado, por excelência, é o órgão central do metabolismo, o que o torna alvo de estudos básicos (metabolismo) e aplicados (doenças, como a artrite reumatoide). Para tal, técnicas utilizando o órgão íntegro ou em frações celulares são de grande valor científico.

1.1. Perfusão hepática

A perfusão do fígado é uma técnica na qual o vaso aferente (de entrada, veia porta) e o vaso eferente (de saída, veia cava) do órgão são canulados. Dessa forma, o experimentador pode controlar o líquido arterial e colher o líquido venoso (perfusado), para análise posterior.

No fígado em perfusão podem ser medidas várias vias metabólicas, como a neoglicogênese, a glicólise, a glicogenólise, a cetogênese, a captação de ácidos graxos, a frutólise, o metabolismo do glicerol, a biotransformação de drogas e assim por diante. Por exemplo, a gliconeogênese é uma via anabólica responsável pela produção da glicose (em condições metabólicas específicas) a partir de precursores estruturalmente simples como piruvato, lactato e alanina. Após a infusão de um desses substratos pode-

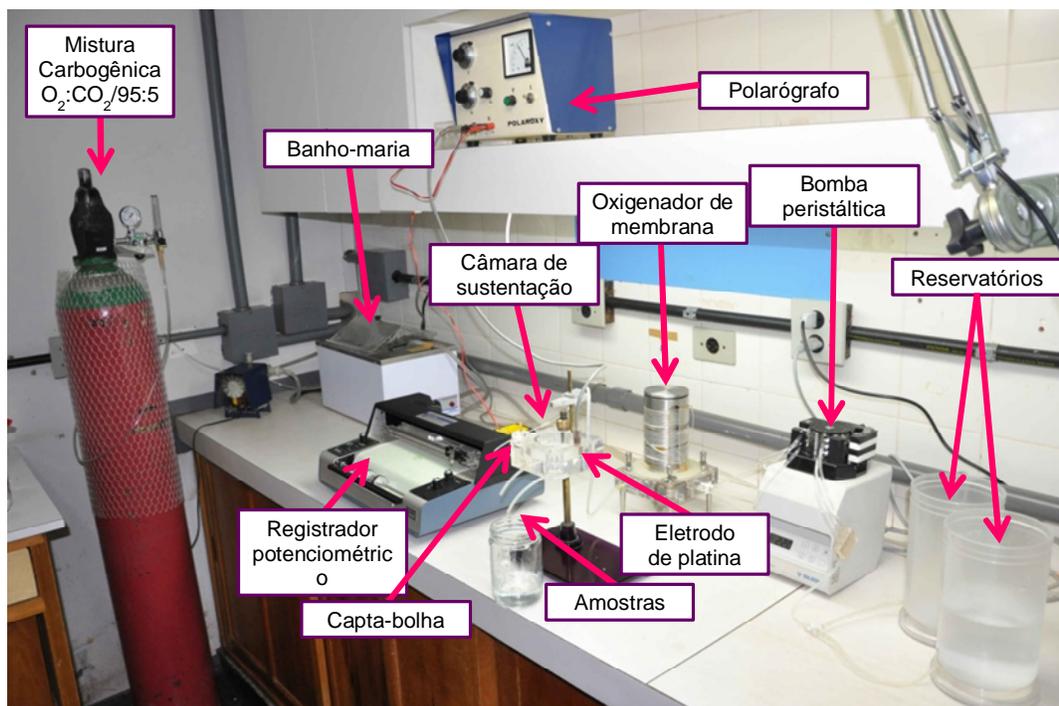
Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

se medir no perfusado a formação de piruvato, glicose, lactato e de outros parâmetros, além do consumo de oxigênio.

A figura 1 ilustra as principais partes do sistema de perfusão monovascular utilizado no Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá. Ele é formado por uma bomba peristáltica, um oxigenador de membrana e pela câmara do fígado. A este sistema estão acoplados um microeletrodo de platina com polarógrafo, um registrador potenciométrico, um banho-maria com bomba de circulação externa do líquido e um cilindro contendo a mistura carbogênica ($O_2:CO_2/95:5$).

O tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato é o líquido de perfusão padrão. O pH deste tampão é inicialmente ajustado em 7,6 e após saturação com a mistura carbogênica o pH desce para 7,4. Neste é adicionado albumina de soro bovino, que ajuda na manutenção da integridade do órgão. Substratos e drogas podem ser infundidos diretamente ou dissolvidos no líquido de perfusão.

Figura 1. Representação da aparelhagem de perfusão do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade de Maringá. Os componentes estão indicados na figura.



O oxigenador de membrana é formado por um cilindro de alumínio ao redor do qual estão enrolados tubos de borracha de silicone. A câmara interna do cilindro de alumínio é termostatizada pelo banho-maria com bomba de circulação externa. O

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

cilindro de alumínio está separado do meio ambiente por uma cobertura cilíndrica de plástico transparente, mantendo no seu interior uma atmosfera rica em oxigênio.

A câmara do fígado é de acrílico transparente, contém um capta-bolhas, uma câmara para a coleta de amostras e um dispositivo de inserção e fixação do eletrodo de platina. O líquido de perfusão é impulsionado pela bomba peristáltica em direção ao oxigenador, de forma que seu fluxo deve ser ajustado conforme o peso do animal. Neste local ocorrem simultaneamente a oxigenação e o aquecimento para 37 °C. O líquido segue para a câmara do fígado, entra no órgão e após passar pelo eletrodo de platina, a amostra é coletada.

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).

1.2. Estresse oxidativo

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. A elevada concentração de ROS causa danos moleculares às estruturas celulares com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecido adiposo e cerebral. 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 artrite reumatoide, aterosclerose, a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer.

Em condições fisiológicas aproximadamente 1 a 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias são convertidos em ROS e radicais livres devido à incompleta redução do oxigênio por reações de transferência de elétrons. As espécies reativas de oxigênio incluem o radical ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$). 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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

O radical $\bullet\text{OH}$ é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. O H_2O_2 é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares e facilmente gerar o radical $\bullet\text{OH}$. O H_2O_2 oxida proteínas que apresentam resíduos de metionina ou grupo tiol muito reativos, por exemplo, GSH. O $\bullet\text{O}_2^-$ ao contrário da maioria dos radicais livres é inativo. Em meio aquoso, sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio.

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, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, além das moléculas glutathione reduzida, glutathione oxidada, vitamina C e vitamina E.

1.3. Artrite reumatoide

A artrite reumatoide é uma doença autoimune caracterizada pela inflamação crônica e sistêmica, que afeta as membranas sinoviais, cartilagens articulares e ossos. A patofisiologia da artrite envolve uma hiperplasia intensa da cartilagem articular, com a participação de células T, células B, macrófagos, fibroblastos e citocinas pró-inflamatórias. Além das citocinas, as ROS, também desempenham um papel importante na artrite reumatoide. O excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias estimulam os neutrófilos e macrófagos a produzirem ROS no fluido sinovial, que atuam como mediadores de lesão tecidual.

Além de afetar a cartilagem articular, a artrite reumatoide provoca respostas inflamatórias com alterações imunológicas em outros órgãos, como o fígado. Para o minicurso foi escolhido um modelo animal de artrite induzida por adjuvante padronizada pelo Laboratório de Inflamação da Universidade Estadual de Maringá.

1.4. Gliconeogênese hepática

O glicogênio é a reserva de glicose que se encontra principalmente no fígado e nos músculos. É rapidamente utilizável nos intervalos entre as refeições, durante a

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

atividade muscular, dieta baixa em carboidratos e após um trauma. O glicogênio encontra-se no citoplasma celular sob a forma de grânulos que contêm também as enzimas que participam do seu metabolismo.

A reserva corporal de glicogênio pode ser suficiente para suprir as necessidades de glicose de um dia, entretanto quando o jejum se prolonga por mais de oito horas, o organismo recorre à gliconeogênese (figura 2) no intuito de manter os níveis homeostáticos.

O fígado desempenha um papel fundamental na manutenção dos níveis de glicose sanguínea durante o jejum, ao converter seu glicogênio armazenado em glicose (glicogenólise) e ao sintetizar a glicose, principalmente a partir de moléculas precursoras não glicídicas, incluindo lactato, piruvato, glicerol e muitos aminoácidos (gliconeogênese). Isso é de vital importância, já que o cérebro e os eritrócitos dependem fundamentalmente da glicose para satisfazer suas necessidades energéticas.

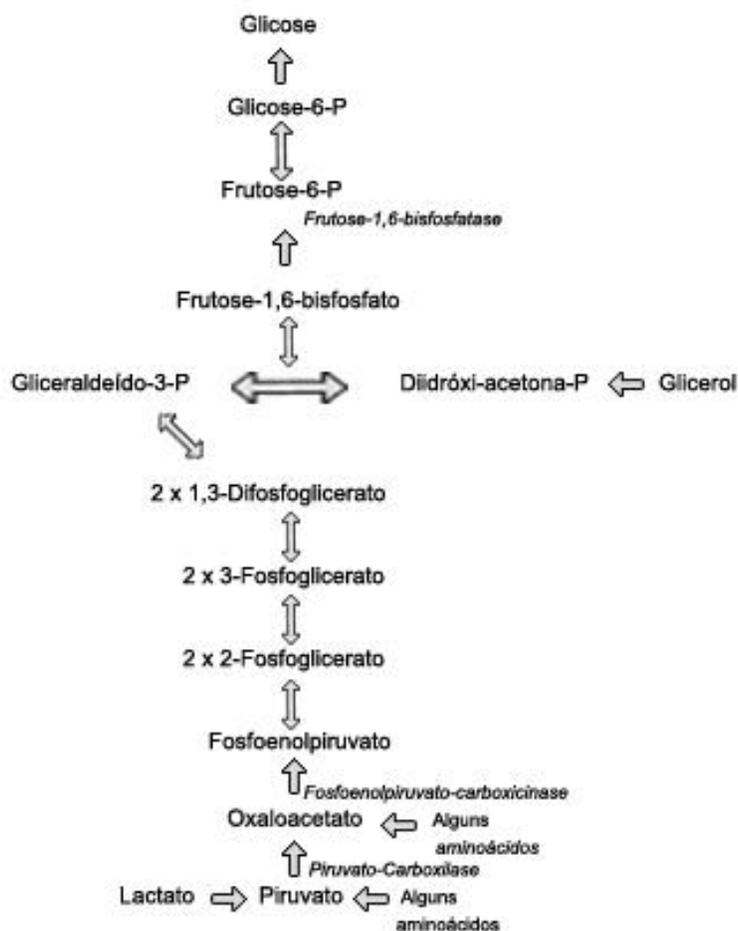


Figura 2. Gliconeogênese hepática. (Fonte: Cingolani; Houssay; 2003).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

O músculo quando está em uma atividade física intensa, faz a fermentação, convertendo a glicose armazenada em lactato. O lactato cai na corrente sanguínea e vai para o fígado, onde, por ação da lactato-desidrogenase e em presença de NAD^+ , se transforma em piruvato que é utilizado na gliconeogênese.

No estado de jejum, o tecido adiposo quebra seus estoques de triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol. O glicerol vai para fígado e pode ser convertido em glicose.

Um dos sinais mais importantes para ocorrer a gliconeogênese é a liberação de glicocorticóides pelo córtex adrenal. Quando quantidades normais de carboidratos não estão disponíveis para as células, a adenohipófise começa a secretar quantidades aumentadas do hormônio corticotropina. Isto leva o córtex adrenal a produzir grandes quantidades de glicocorticóides, especialmente o cortisol. Este mobiliza as proteínas das células de todo o organismo, disponibilizando-as na forma de aminoácidos nos líquidos corporais. Uma grande quantidade é rapidamente desaminada no fígado, fornecendo substratos para a conversão em glicose.

1.5. Resultados de estudos da gliconeogênese em fígados artríticos

Modificações nas propriedades de sistemas de membranas isoladas, organelas ou órgãos intactos, incluindo o fígado, foram demonstrados em ratos com artrite induzida por adjuvante. Os resultados revelaram que o fígado de ratos com artrite induzida por adjuvante apresenta um estresse oxidativo acentuado com alta lesão de lipídios e proteínas.

Os fígados de ratos artríticos produzem menos glicose e uréia que fígados de ratos normais a partir de substratos precursores do oxalacetato e do aspartato, o que sugere o envolvimento de enzimas chaves da gliconeogênese. É possível que a atividade da piruvato carboxilase ou da fosfoenolpiruvato carboxiquinase encontrem-se alteradas nesta situação. A atividade da piruvato carboxilase é essencialmente dependente de cátions bivalentes, principalmente o magnésio, e monovalentes, em especial o potássio. Uma das hipóteses possíveis seria que a dependência destes cátions pudesse estar alterada na artrite.

Em fígados de ratos artríticos, as velocidades de produção de glicose foram menores com L-alanina e piruvato como substratos, mas com L-lactato e sorbitol não foram encontradas diferenças quando comparadas com a condição normal. Estas

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

diferentes respostas do rato artrítico estão provavelmente relacionadas: a capacidade gliconeogênica prejudicada dos fígados quando a L-alanina e o piruvato, mas não o L-lactato e o sorbitol, são os precursores gliconeogênicos.

Foi sugerido, que a regulação da gliconeogênese com piruvato como substrato ocorre em um sítio entre a fosfoenolpiruvato e a glicose. Assim, a explicação mais provável para a supressão do estímulo da gliconeogênese quando o piruvato e a L-alanina foram os substratos é a de que uma inibição em uma etapa que precede a síntese da fosfoenolpiruvato e que não está envolvida na gliconeogênese a partir de L-lactato tenha limitado os mecanismos regulatórios induzidos pela noradrenalina. Esta etapa poderia ser a transferência de equivalentes de redução da mitocôndria para o citosol e, para a L-alanina como substrato, também a reação da alanina aminotransferase.

2. OBJETIVOS

Ensinar as técnicas de perfusão hepática e duas técnicas de avaliação do estado oxidativo com o intuito de mostrar alterações que podem ocorrer no metabolismo utilizando o modelo animal de artrite como exemplo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos Holtzman, pesando em torno de 200 g, foram injetados na pata traseira esquerda com 0,1 ml de Adjuvante de Freund (*Micobacterium tuberculosis*, obtido a partir da estirpe H37Rv humano, inativado pelo calor). Os animais que apresentem lesões características em 18 dias após a injeção adjuvante foram selecionados para os experimentos. Todos os experimentos de indução de artrite adjuvante são feitas de acordo com as diretrizes éticas mundialmente aceitas para a experimentação animal e previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá.

Para os experimentos os ratos serão submetidos a um jejum de 18 horas.

3.2. Procedimento para perfusão hepática

3.2.1. Soluções

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

I. Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato:

- Solução A: NaCl 116 mM;
- Solução B: NaHCO₃ 25 mM;
- Solução C: KCl 5,9 mM, Na₂SO₄ 1,2 mM, MgCl₂ 1,18 mM; NaH₂PO₄ 1,24 mM;
- Solução D: CaCl₂ 2,5 mM.

II) Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato puro (KH) (para cada animal):

Colocar em um béquer 2400 mL de água destilada, 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).

III) Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato contendo L-alanina 5 mM:

Separar 1200 mL de tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato puro e dissolver 0,5345 g de L-alanina (PM 89,09). Ajustar o pH para 7,6.

3.2.2. Procedimento cirúrgico

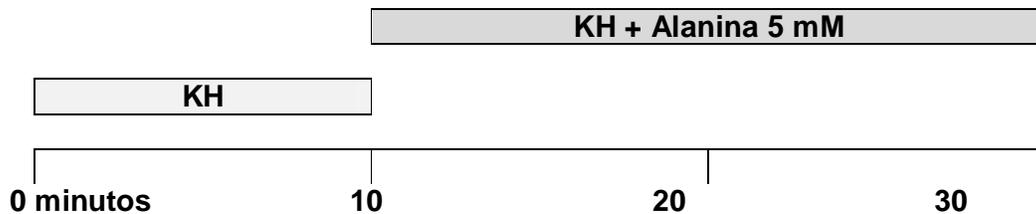
Para remoção cirúrgica do fígado, o rato é previamente anestesiado com tiopental sódico (50 mg/kg). O animal é deitado em decúbito dorsal numa plataforma ao lado da câmara do fígado. O abdômen é aberto longitudinalmente. O estômago é separado do esôfago. Desloca-se o estômago e os intestinos para o lado esquerdo do rato (direito do operador), para expor a veia porta e uma porção da veia cava inferior nas proximidades do rim direito. Coloca-se uma ligadura na veia esplênica, para ocluí-la. Colocam-se duas ligaduras frouxas ao redor da veia porta e uma ligadura frouxa ao redor da veia cava inferior. Diminui o fluxo do líquido de perfusão. Segurando com uma pinça fina o operador deverá efetuar uma pequena incisão na veia porta e introduzir a ponta da cânula. Após o dessangramento do fígado (cor marrom-avermelhada), devem-se amarrar as ligaduras da veia porta. Secciona-se a veia cava inferior distalmente. Deve-se abrir o tórax, cortando o esterno, o diafragma e as costelas para exposição completa do coração. Aumenta-se o fluxo para a inserção da cânula da veia cava. Então, colocam-se duas ligaduras ao redor da veia canulada. Amarra-se a um mesmo laço as porções anteriormente seccionadas do diafragma. Deve-se remover o fígado cortando por baixo do diafragma, segurando a cânula da veia cava através das

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

ligaduras, até uma completa separação do órgão do restante do animal, para então posicioná-lo na plataforma. 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).

3.2.3. Protocolo experimental

Após verificar que o consumo de oxigênio está estável, dar início ao experimento acionando o cronômetro e coletando a primeira amostra (perfusado). Coletar as amostras de 2 em 2 minutos conforme o esquema abaixo.



Tubos:

02 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

3.2.4. Dosagem enzimática de glicose por kit

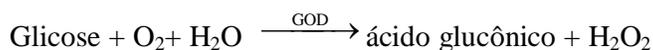
I) Procedimento (microplaca):

	Branco	Padrão	Amostra
Mistura reativa	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
KH	0,1 mL	-	-
Padrão	-	0,1 mL	-
Perfusado	-	-	0,1 mL

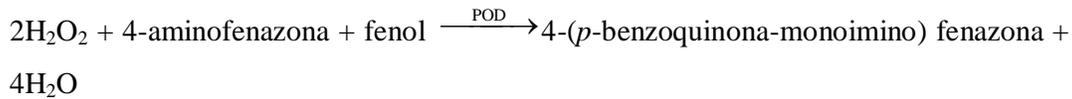
- Incubar em banho-maria a 37 °C por 20 minutos;
- Ler em espectrofotômetro a 505 nm.

II) Princípio da técnica:

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.



Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015



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

3.2.5. Procedimentos para a avaliação da concentração venosa de oxigênio

I) 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 saturada com ar; a 37 °C e à pressão atmosférica, esta concentração é aproximadamente igual a 190 μM no papel do registrador isto corresponde a x cm.

II) Após a substituição do ar pela mistura carbogênica (O₂:CO₂/95:5), a concentração do oxigênio aumenta e, depois de algum tempo, estabiliza-se em torno de 860 μM. A deflexão do registrador ultrapassa os limites do papel, sendo necessário compensar (y cm).

III) A concentração de oxigênio no perfusado venoso pode ser determinada medindo-se a distância entre o ponto nulo e a posição do traçado da pena (z cm).

3.2.6. Cálculo dos fluxos metabólicos

Os fluxos metabólicos serão expressos em μmol por minuto por grama de fígado (μmol/min.g). A fórmula geral para o cálculo nas dosagens é:

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

O fator para a dosagem enzimática da glicose é:

$$\text{Fator} = \frac{\text{fluxo} \times \text{concentração do padrão}}{\text{peso do fígado} \times \text{absorbância do padrão}}$$

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

$$\text{Fator} = \left(\frac{\text{fluxo}}{\text{peso do fígado} \times 1000} \right) \times \left(860 - \left(\frac{(z + y) \times 190}{x} \right) \right)$$

3.3. Estresse oxidativo

3.3.1. Preparação do homogenato de fígado para determinação dos conteúdos de glutatona reduzida (GSH) e atividade da catalase (CAT)

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Os conteúdos de GSH e a atividade da enzima antioxidante CAT serão determinados no homogenato de fígados de ratos controle e artrítico. Para a realização destes ensaios, os ratos serão decapitados e o fígado retirado por laparotomia e clampeado em nitrogênio líquido, pesado e separado em uma porção de 2,0 g. Essa porção será macerada e homogeneizada com homogeneizador Van Potter em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) (tudo em gelo). Para a determinação da atividade específica da CAT, o homogenato será centrifugado para a obtenção do sobrenadante.

3.3.2. Dosagem Fluorimétrica de GSH e princípio da técnica

Para a realização deste ensaio, o homogenato será adicionado a um meio de precipitação contendo sacarose 125 mM, KCl 65 mM e Hepes 10 mM, pH 7,4. A esta mistura serão adicionados ácido tricloroacético (TCA) 13%. Após centrifugação, o conteúdo de GSH será dosado, através da adição de alíquotas desse sobrenadante em tampão fosfato 0,1 M + EDTA 5,0 mM (pH 8,0). Para avaliação do conteúdo de GSH, serão utilizados padrões, através da adição de GSH 1,0 mg%. A adição de OPT a esse sobrenadante 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 é então determinado.

Após a realização da primeira leitura, uma segunda leitura será realizada com a adição do padrão nas amostras. Essa segunda leitura, tem como finalidade eliminar interferências, causadas pela presença de proteínas, sobre a fluorescência do composto GSH-OPT (quenching).

3.3.3. Cálculo GSH

A quantidade de GSH existente no tecido hepático será calculada de acordo com a fórmula:

$$Q_{\text{GSH}} = \left(C_p \times \left(\frac{F_a - F_b}{F_p - F_a} \right) \right) \times \frac{15}{\text{mg prot}}$$

C_p = Concentração de padrão GSH 0,4 μg (40 μl de GSH 1,0 mg%)

F_a = Fluorescência da Amostra

F_b = Fluorescência do Branco

F_p = Fluorescência do padrão + Fluorescência da Amostra.

A concentração de GSH será expressa em termos de μg GSH/mg de proteína

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

presente no homogenato.

3.3.5. Determinação da atividade específica da catalase (CAT) e princípio da técnica

A atividade da enzima CAT será avaliada pela decomposição enzimática do H₂O₂ medida diretamente por espectrofotometria em 240 nm. O sobrenadante diluído será adicionado a uma solução contendo Tris 50 mM, EDTA 0,25 mM e H₂O₂ 30 mM (pH 8,0) e a queda da absorbância monitorada por um minuto a 25°C.

3.3.6. Cálculo da CAT

A velocidade inicial da reação será extrapolada e a atividade da enzima (Acat) será calculada utilizando o coeficiente de extinção do H₂O₂ (ϵ , 33,1 M⁻¹), e os valores expressos como $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min. mg de proteína}$ com a fórmula:

$$\text{Acat} = \frac{\left(\left((x \times 0,1) \div y \right) \div 33,1 \right) \times 1000}{\text{mg prot}}$$

x = cateto oposto ao ângulo formado

y = cm correspondentes a 0,1 de absorbância

3.3.7. Procedimento para a dosagem de proteínas

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

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

Adicionar em tubos de ensaio:

	Branco	Padrão	Amostra
Água	100 μL	-	-
Padrão	-	100 μL	-
Amostra diluída	-	-	100 μL
Mistura reativa	1000 μL	1000 μL	1000 μL
• Homogeneizar e aguardar 10 min (ambiente)			
Folin 1N	100 μL	100 μL	100 μL

- Homogeneizar e aguardar 10 min (ambiente)
- Ler 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%.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

3.3.8. *Cálculo proteínas*

$$\frac{\text{mg}}{\text{mL}} = \left(\frac{\text{Absorbância da Amostra} \times 20}{\text{Absorbância do padrão}} \right) \times \frac{\text{diluição}}{100}$$

4. Referências Bibliográficas

Babeto de Sá-Nakanishi, A.; Comar, J.F.; Kelmer-Bracht, A. M.; Bracht, A. Determinação da atividade da piruvato-carboxilase em fígados de ratos artríticos. 2003.

Bracht, A.; Ishii-Iwamoto, E. L.; Kelmer-Bracht, A. M. 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, 2003.

Cingolani, H. E.; Houssay, A. B. Fisiologia Humana de Houssay. 7ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

Comar, J. F.; Babeto de Sá-Nakanishi, A.; de Oliveira AL, Marques Nogueira Wendt M, Bersani Amado CA, Ishii Iwamoto EL, Peralta RM, Bracht A. Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. 2013.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. Trad. Bárbara de Alencar Martins et al. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2006.

Halliwell, B. Free radicals and antioxidants: A personal view. Nutrition reviews, 52:253-265, 1994.

Hissin, P. J.; Hilf, R. A fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Analyt Biochem*, 74:214-226, 1976.

Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. Princípios de Bioquímica. Editora Savier, Quarta Edição, 2007.

Linnane, A. W.; Marzuki, S.; Ozawa, T.; Tanaka, M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative disease. *Lancet* 1, 642-645, 1989.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:131-138, 1956.

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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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

Silva, P. M. S.; Ishii-Iwamoto, E. L.; Salgueiro-Pagadigorria, C. L. Influência na artrite induzida por adjuvante nas propriedades cálcio-dependentes de mitocôndrias isoladas e na resposta neoglicogênica de fígados à noradrenalina. 2007.

Silverthorn, D. U. *Fisiologia humana: uma abordagem integrada*. 2ª. ed. Trad. Ivana Beatrice Mânica da Cruz. São Paulo: Manole, 2003.

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

Minicurso 07

Técnicas básicas de biologia molecular:

Clonagem do gene da proteína kin17

Laboratório de Organização Funcional (Bloco B36/sala 01)

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez

Ministrantes: Anelise Cardoso Ramos, Douglas Vinicius Bassalobre de Freitas,

Francisco Ferreira Duarte Junior, José Renato Pattaro Junior, Lorena Polizelli e Sabrina

Kelmer

INTRODUÇÃO

Princípios Básicos da Clonagem Molecular

No início da década de 1970, uma nova maneira de analisar as principais moléculas constituintes de uma célula começou a ser praticada. Essas metodologias inovadoras foram chamadas de tecnologia do DNA recombinante, permitindo o isolamento de genes específicos em grande quantidade, assim como a modificação e reintrodução destes em células e organismos (Zaha et al., 2012).

A clonagem de DNA envolve a separação de um gene específico ou segmento de DNA de um cromossomo maior, o qual é ligado a uma molécula de DNA pequena que atua como portadora e introduzido em uma célula hospedeira. O DNA modificado é replicado milhões de vezes por um aumento do número das células hospedeiras. O resultado é a amplificação seletiva de um gene ou segmento de DNA particular. A clonagem do DNA de qualquer organismo envolve cinco procedimentos gerais (Figura 1) (Nelson e Cox, 2011):

1. *O corte do DNA em locais específicos.* Endonucleases que reconhecem e clivam curtas sequências específicas de ácidos nucleicos (endonucleases de restrição) fornecem as “tesouras moleculares” necessárias para o isolamento do fragmento de DNA de interesse.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

2. *A seleção de uma molécula pequena de DNA capaz de autorreplicação em um organismo hospedeiro.* Estas moléculas de DNA são chamadas de vetores de clonagem, os quais podem ser plasmídeos bacterianos, DNAs virais, etc.
3. *Ligação covalente de dois fragmentos de DNA.* A enzima DNA-ligase liga o vetor de clonagem e o fragmento de DNA a ser clonado (inserto). As moléculas de DNA compostas compreendendo os segmentos covalentemente ligados são chamadas de DNA recombinante.
4. *A passagem do DNA recombinante para a célula hospedeira* que irá fornecer a maquinaria enzimática para a replicação do DNA. O organismo mais comumente utilizado como hospedeiro é a bactéria *Escherichia coli*. Um dos métodos mais utilizados para se introduzir segmentos de DNA em *E. coli* (transformação bacteriana) consiste em submeter as células e o DNA a um choque térmico (0°C – 42°C) que permite a captação do DNA por algumas células por razões ainda pouco compreendidas (Sambrook e Russel, 2001).
5. *A seleção ou a identificação das células hospedeiras que contém o DNA recombinante.* A forma mais utilizada para se identificar recombinantes em *E. coli* consiste na identificação visual por meio da coloração exibida pela colônia transformante. Os vetores que utilizam esta estratégia possuem um gene que resulta em resistência à ampicilina e o gene *lacZ'*, que codifica uma parte da enzima β -galactosidase (β -gal), responsável pela quebra da lactose em glicose e galactose. A presença de um inserto no vetor de clonagem resulta na inativação do gene *lacZ'* e os recombinantes são identificados pela sua incapacidade de sintetizar a enzima ativa. Assim, a seleção das colônias contendo plasmídeos recombinantes é feita em meio sólido contendo ampicilina e X-gal, um análogo da lactose que, quando degradado pela β -galactosidase ativa, produz um composto que confere à colônia uma coloração azul escura. A inserção de plasmídeos recombinantes resulta em colônias de coloração branca (Figura 2) (Zaha et al., 2012).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

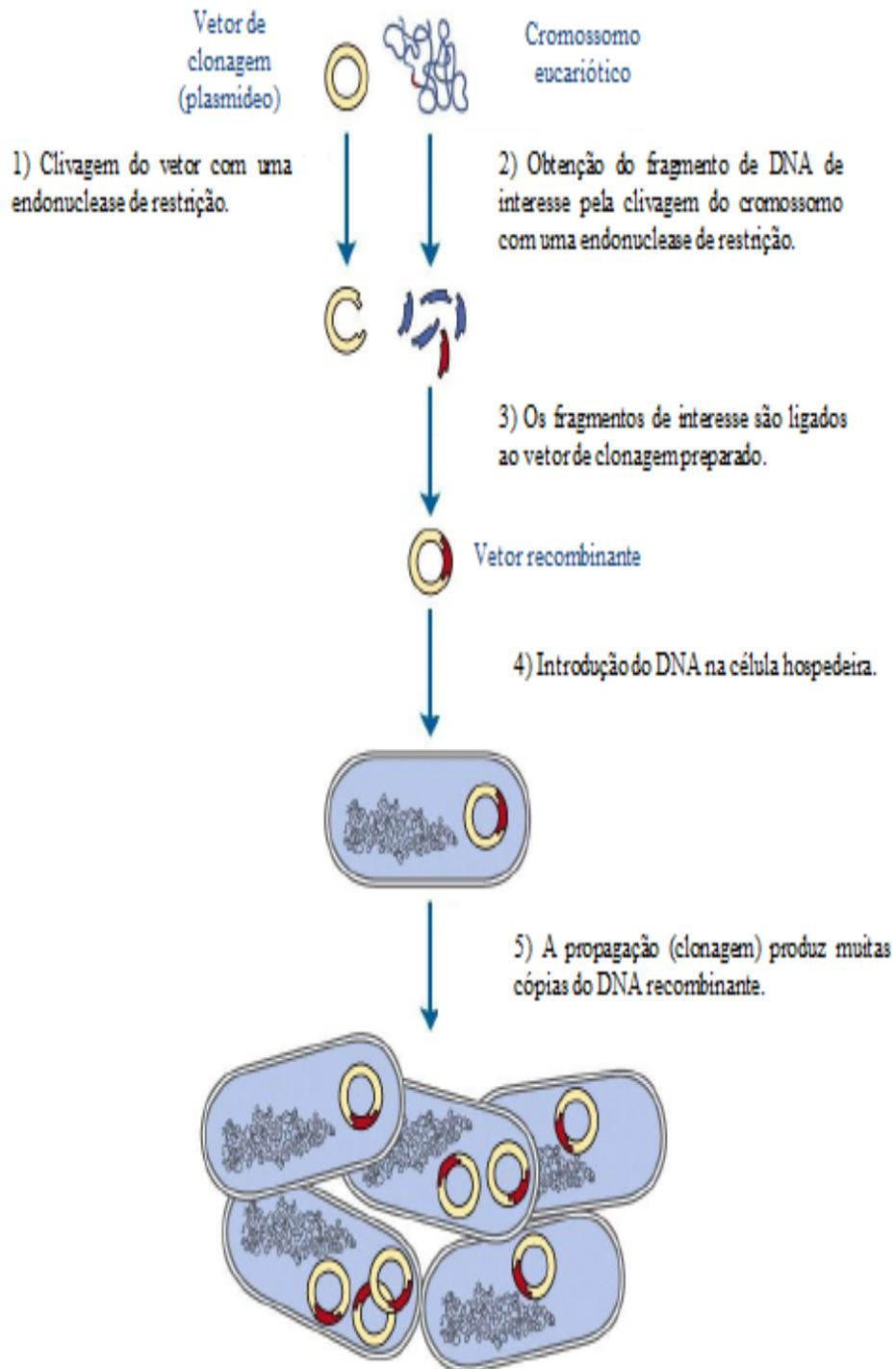


Figura 1. Ilustração esquemática da clonagem de DNA. Adaptado de Nelson e Cox, 2011.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

meio de reação. O ciclo de aquecimento, resfriamento e replicação é repetido 25 ou 30 vezes durante poucas horas em um procedimento automático, amplificando o segmento do DNA flanqueado pelos iniciadores, podendo ser rapidamente analisado e/ou clonado. Polimerases resistentes ao calor, tais como a Taq polimerase (oriunda de uma bactéria que vive a 90°C), são usadas na PCR. A enzima permanece ativa após cada passo de aquecimento e não necessita ser reposta. O desenho cuidadoso dos iniciadores usados na PCR, tais como a inclusão de sítios de clivagem para endonucleases de restrição, pode facilitar a subsequente clonagem do DNA amplificado.

O método da PCR é sensível o bastante para detectar e amplificar poucas moléculas de DNA em quase todo tipo de amostra. Embora o DNA degrade lentamente com o passar do tempo, o DNA tem sido clonado com sucesso pela PCR, com amostras acima de 40.000 anos de idade. A técnica tem sido usada para clonar fragmentos de DNA originário de humanos que permanecem mumificados e animais extintos, tais como o mamute lanoso, criando novos campos de arqueologia e paleontologia moleculares. O DNA, oriundo de sítios arqueológicos, tem sido amplificado por PCR e utilizado para traçar as migrações humanas da Antiguidade. Epidemiologistas podem usar a PCR em DNA de amostras de restos humanos para traçar a evolução de vírus patogênicos humanos. Além de sua utilidade para a clonagem de DNA, a PCR é uma nova e potente ferramenta na medicina forense. Ela também tem sido usada para a detecção de infecções virais, antes de causarem sintomas, e em diagnóstico pré-natal de uma larga variedade de doenças genéticas (Nelson e Cox, 2011).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

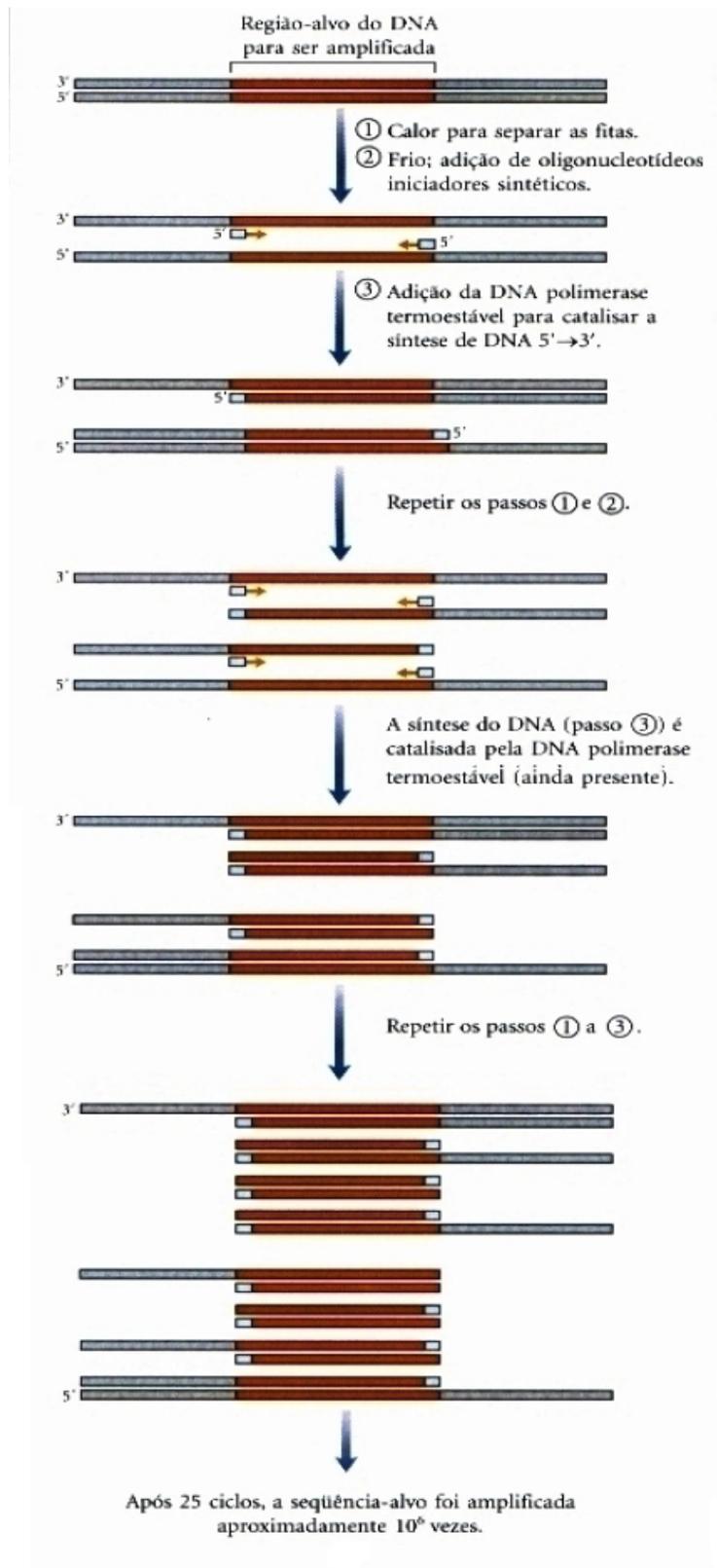


Figura 3. Esquema da PCR (detalhes no texto).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

A Proteína kin17

A proteína kin17 foi descoberta em 1989 em cultura de células da linhagem FR 3T3 de rato, devido à reação cruzada com anticorpos policlonais dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli* (Angulo et al., 1989), a qual participa do reparo recombinacional do DNA e na regulação de genes da resposta SOS. Tal resposta acontece na presença de grande quantidade de danos letais no DNA, resultando na ativação de aproximadamente 20 genes envolvidos no reparo e na recombinação do DNA (Anderson e Kowalczykowski, 1998). Tal reação cruzada ocorre devido à presença de uma região conservada de 40 aminoácidos (posições 162-201) (**RH**, Figura 4) que apresenta homologia de 49% com a extremidade C-terminal da RecA, a qual atua na regulação da ligação ao DNA (Angulo et al., 1991). Adicionalmente, a kin17 apresenta um sinal de localização nuclear (**NLS**, Figura 4) e um motivo dedo de zinco de ligação ao DNA (**ZF**, Figura 4), ambos homólogos àqueles observados na proteína de reparo poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) (Mazin et al. 1994). Recentemente, um motivo KOW foi identificado entre os aminoácidos 330 e 363, sendo confirmado por análise de cristalografia da extremidade C-terminal da kin17 (le Maire et al., 2006). Tais motivos estão relacionados com interações proteína-RNA e proteína-proteína nos processos de metabolismo do RNA (Steiner et al., 2002).

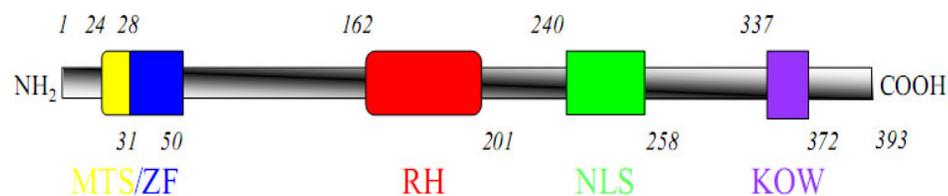


Figura 4. Domínios funcionais da proteína kin17. **MTS:** sinal putativo de localização mitocondrial; **ZF:** dedo de zinco; **RH:** domínio de homologia à proteína RecA de *E. coli*; **NLS:** sinal de localização nuclear; **KOW:** motivo KOW. Extraído de Despras, 2006.

O gene KIN17 está situado no cromossomo 2 em murinos e no braço curto do cromossomo 10 em humanos, codificando para uma proteína de aproximadamente 45 kDa e ponto isoelétrico de 9,3 (Angulo et al., 1991; Kannouche et al., 2000). O gene é conservado filogeneticamente em eucariotos, visto que foram identificados ortólogos

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

em organismos diversos como o vegetal *Arabidopsis thaliana*, o inseto díptero *Drosophila melanogaster*, o nematóide *Brugia malayi* e a levedura *Schizosaccharomyces pombe* (Despras et al., 2003).

Uma série de estudos identificaram o papel da kin17 em processos nucleares, principalmente na replicação e no reparo do DNA. Células transfectadas com RNA antisense da kin17, apresentando assim baixos níveis da proteína, apresentam taxa reduzida de síntese de DNA, acúmulo na fase S e são mais sensíveis à mutagênese (Biard et al., 2002; Despras et al., 2003). Em contrapartida, a superexpressão da proteína resulta em inibição da proliferação celular (Kannouche e Angulo, 1999), indicando que o nível da expressão da kin17 deve ser estritamente regulado para o funcionamento adequado do ciclo celular. Agentes mutagênicos como radiação ionizante e luz ultravioleta induzem uma resposta tardia da kin17, resultando em aumento da expressão e alteração da localização nuclear (Kannouche et al., 2000; Biard et al., 2002).

Recentemente, foi constatado que a kin17 está associada ao complexo multiprotéico de replicação do DNA, em conjunto com outras proteínas como a RPA70 (*human replication protein A*), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) e DNA polimerase α . Além disso, tal proteína associa-se diretamente a certas regiões de origens de replicação. Complexos multiprotéicos isolados de células HeLa (provenientes de carcinoma cervical humano) capazes de realizar replicação do DNA *in vitro* apresentam atividade reduzida quando a kin17 é inibida por imunodepleção (Miccoli et al., 2005). Em muitas linhagens celulares derivadas de tumores, foi constatado um alto nível de expressão da kin17 (Kannouche et al., 2000; Despras et al., 2003), assim como em tecidos tumorais de pacientes de câncer de mama (Zeng et al., 2011). Este último estudo apontou que a kin17 pode ser um potencial alvo no tratamento desse tipo de câncer, e correlacionou a expressão dessa proteína com fatores de regulação do ciclo celular, como a ciclina D1 e o ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*). Os dados obtidos até o momento sugerem que a kin17 pode atuar como um elo de ligação entre processos de replicação e reparo do DNA, impedindo a parada do ciclo celular devido a presença de lesões não reparadas no DNA. Além disso, a proteína kin17 também é parte do spliceossomo (Rappsilber et al., 2002) e pode ser capaz de se associar diretamente a moléculas de mRNA durante a espermatogênese, demonstrando

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

que a proteína apresenta um papel no processamento do RNA. Tais processos podem ser regulados pela presença do motivo KOW (Pinon-Lataillade et al., 2004).

PROTOCOLOS

1) Amplificação do gene *kin17* através de PCR utilizando a Taq DNA polimerase (Invitrogen)

- Adicionar em um tubo de 0,2 ml os seguintes componentes:
 - 13,5 µl de H₂O estéril e destilada
 - 2 µl de 10x PCR buffer
 - 0,75 µl de MgCl₂ 50mM
 - 0,5 µl de dNTP mix 10mM
 - 0,5 µl de primer forward
 - 0,5 µl de primer reverse
 - 0,25 µl de Taq DNA polimerase
 - 2 µl de cDNA first-strand
- Colocar a reação em um termociclador com a seguinte programação de ciclos de temperatura:
 - 94°C / 5 min - Temperatura inicial para desnaturação do DNA
 - | | |
|---|--|
| } | - 94°C / 1 min - Desnaturação |
| } | - 60°C / 1 min - Temperatura para anelamento dos primers |
| } | - 72°C / 1 min - Extensão do DNA |
 - 72°C / 10 min - Extensão final
 - 4° C / Indefinidamente – Armazenamento

2) Eletroforese em Gel de Agarose

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%

30 ml de TBE 0,5X

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

0,3 g agarose

Brometo de etídeo (1 mg/ml)

Usar 1 μ l 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.

- Preparar a solução de agarose em frasco de Erlenmeyer e aquecê-la em forno de microondas por 2 min na potência 4. O frasco deve ser agitado ao final até a completa homogeneização do gel;
- Após a solubilização, a solução de agarose deve ser ligeiramente 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;
- Assim que o gel estiver pronto, colocá-lo na cuba de eletroforese e submergi-lo em TBE 0,5X;
- Em parafilme misturar 3 μ l de cada amostra mais 1 μ l de RNA loading buffer e aplicar no gel com uma micropipeta;
- Submeter as amostras a eletroforese a uma voltagem de 110V, por aproximadamente 30 min;
- Visualizar as amostras 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).

3) Transformação por choque térmico

Meio SEC

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

10 µl de MgCl 1 M

10 µl de MgSO₄ 1 M

20 µl de glicose 1 M

Meio LB para 1 ml

LB ágar para seleção de bactérias transformadas

40 µl de X-gal 20 mg/ml

200 µl de ampicilina 5 mg/ml

10 µl de IPTG 20 mg/ml

Meio LB ágar para 20 ml

- Descongelar as bactérias competentes (estocadas no freezer a -80°C) no gelo por aproximadamente 10 minutos;
- Misturar, em um tubo de 1,5 ml, 50 µl de bactérias competentes e 4 µl do DNA a ser transformado (tubos previamente resfriados no gelo);
- Incubar a mistura por 30 min no gelo;
- Efetuar um choque térmico: 2 min a 42°C seguido de 2 min no gelo;
- Adicionar 450 µl de meio SEC;
- Incubar por 1 h a 37°C sob leve agitação;
- Semear por espalhamento com alça de Drigalski em placa contendo meio de seleção e incubar a 37°C por aproximadamente 16 h (SUGESTÃO: semear 50 µl da cultura em uma placa de 20 ml e centrifugar o restante por 2 min a 4000 rpm para em seguida ressuspender em 50 µl e semear em outra placa).

4) Extração de DNA plasmidial pelo método de fervura utilizando STET e CTAB

- Centrifugar 1,5 ml de cultura de bactérias em microtubo por 2 min a 8000 rpm (repetir o processo duas vezes);
- Ressuspender em 300 µl de STET (sacarose 8%; EDTA 50 mM; Triton X-100 0,1% e Tris-HCl 50 mM pH 8,0);
- Adicionar 6 µl de lisozima (50 mg/ml) e incubar por 5 min à temperatura ambiente;
- Incubar a 95-100°C por 1:30 min e centrifugar por 10 min a 14000 rpm;

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

- Transferir o sobrenadante para um tubo de 1,5 ml novo;
- Adicionar 4 µl de CTAB 5% e misturar até que a solução fique turva;
- Centrifugar por 5 min a 14000 rpm e descartar o sobrenadante;
- Ressuspender o pellet em 300 µl de NaCl 1,2 M e em seguida adicionar 750 µl de etanol 100%;
- Centrifugar por 10 min a 14000 rpm e descartar o sobrenadante;
- Lavar com etanol 70% centrifugando por 5 min a 14000 rpm;
- Descartar o etanol e secar o pellet à temperatura ambiente;
- Ressuspender o pellet em 80 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) acrescido de RNase;
- Incubar por 2 h à temperatura ambiente.

5) Clivagem de DNA plasmidial com a enzima EcoRI

- Preparar uma mistura contendo os seguintes componentes (suficiente para 10 reações de 20 µl):
 - 158 µl de H₂O MilliQ
 - 20 µl de tampão (NEBuffer 4, Biolabs)
 - 2 µl de EcoRI-HF (Biolabs)
- Distribuir a mistura em 10 tubos de 1,5 ml (18 µl por tubo);
- Adicionar a cada tubo 2 µl de DNA plasmidial;
- Misturar e incubar a 37°C por 30 min.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, D. G.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. Reconstitution of an SOS response pathway: derepression of transcription in response to DNA breaks. **Cell** 95: 975-979, 1998.

ANGULO, J. F.; MOREAU, P. L.; MAUNOURY, R.; LAPORTE, J.; HILL, A. M.; BERTOLOTTI, R.; DEVORET, R. Kin, a mammalian nuclear protein immunologically related to *E. coli* RecA protein. **Mutation Research** 217: 123-134, 1989.

ANGULO, J. F.; ROUER, E.; MAZIN, A.; MATTEI, M. G.; TISSIER, A.; HORELLOU, P.; BENAROUS, R.; DEVORET, R. Identification and expression of the cDNA of KIN17, a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein. **Nucleic Acids Research** 19: 5117-5123, 1991.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

BIARD, D. S. F.; MICCOLI, L.; DESPRAS, E.; FROBERT, Y.; CRÉMINON, C.; ANGULO, J. F. Ionizing radiation triggers chromatin-bound kin17 complex formation in human cells. **The Journal of Biological Chemistry** 277: 19156-19165, 2002.

DESPRAS, E. Les proteines kin17, xpc, dna-pkcs et xrcc4 dans la reponse cellulaire aux dommages de l'adn. Etude des relations entre la reparation par excision de nucleotides et la recombinaison non homologue dans un modele syngenique humain. **These de docteur aux biologie cellulaire et moléculaire. Universite Paris V, Paris, França, 2006.**

DESPRAS, E.; MICCOLI, L.; CRÉMINON, C.; ROUILLARD, D.; ANGULO, J. F.; BIARD, D. S. F. Depletion of KIN17, a human DNA replication protein, increases the radiosensitivity of RKO cells. **Radiation Research** 159: 748-758, 2003.

FREITAS, ZFO; RODRIGUES, EG; OLIVEIRA, V; CARMONA, A K; TRAVASSOS, LR. (2004) Melanoma heterogeneity: differential, invasive, metastatic properties and profiles of cathepsin B, D and L activities in subclones of the B16F10-NEX2 cell line. **Melanoma Research**: 14 (5): 333-344.

KANNOUCHE, P.; MAUFFREY, P.; PINON-LATAILLADE, G.; MATTEI, M. G.; SARASIN, A.; DAYA-GROSJEAN, L.; ANGULO, J. F. Molecular cloning and characterization of the human KIN17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans. **Carcinogenesis** 21: 1701-1710, 2000.

LE MAIRE, A.; SCHILTZ, M.; STURA, E. A.; PINON-LATAILLADE, G.; COUPRIE, J.; MOUTIEZ, M.; GONDROY, M.; ANGULO, J. F.; ZINN-JUSTIN, S. A tandem of SH3-like domains participates in RNA binding in KIN17, a human protein activated in response to genotoxics. **Journal of Molecular Biology** 364: 764-776, 2006.

MAZIN, A.; TIMCHENKO, T.; MURCIA, J. M.; SCHREIBER, V.; ÂNGULO, J.; MURCIA, G.; DEVORET, R. Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. **Nucleic Acids Research** 22: 4335-4341, 1994.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PINON-LATAILLADE, G.; MASSON, C.; BERNARDINO-SGHERRI, J.; HENRIOT, V.; MAUFFREY, P.; FROBERT, Y.; ARANEDA, S.; ANGULO, J. F. KIN17 encodes an RNA-binding protein and is expressed during mouse spermatogenesis. **Journal of Cell Science** 117: 3691-3702, 2004.

RAPPSILBER, J.; RYDER, U.; LAMOND, A. I.; MANN, M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. **Genome Research** 12: 1231-1245, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

STEINER, T.; KAISER, J. T.; MARINKOVIC, S.; HUBER, R.; WAHL, M. C. Crystal structures of transcription factor NusG in light of its nucleic acid- and protein-binding activities. **The EMBO Journal** 21: 4641-4651, 2002.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

ZENG, T.; GAO, H.; YU, P.; HE, H.; OUYANG, X.; DENG, L.; ZHANG, Y. Up-regulation of kin17 is essential for proliferation of breast cancer. **Plos One** 6, 2011.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. (org.). **Biologia Molecular Básica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Minicurso 08

Bioquímica e Fisiologia de Microrganismos: Teoria e Aplicabilidade

Laboratório de Bioquímica de Microrganismo (Bloco I89/sala 07)

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Marina Peralta e Profa. Dra. Cristina Giatti

Ministrantes: Aline Cristine, Camila Gabriel Kato, Emanuelle Neiverth de Freitas,

Mariene Nolli, Leonardo Bertonha, Rafael Castoldi e Tatiane Brugnari

1. INTRODUÇÃO

1.1 Microrganismos e biotecnologia

A microbiota é composta por grupos microbianos diversos, incluindo as bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários e vírus. Estima-se que diversidade de microrganismos exceda a de plantas e animais, mas que apenas cerca de 5%, da diversidade de fungos seja conhecida e, 31% e 4%, das espécies de protozoários e vírus, respectivamente.

A diversidade dos microrganismos está relacionada à sua presença em praticamente todos os lugares do planeta. Isso se deve à sua relativa simplicidade morfológica e grande diversidade genética e metabólica, que faz com que os microrganismos se adaptem a condições diversas, como baixa concentração de nutrientes, extremos de temperatura e salinidade.

A relação desses seres vivos com o meio ambiente e com outras espécies e seu papel na manutenção de processos biológicos está ainda pouco elucidada, mas sabe-se que existência e a diversidade dos outros seres vivos estão intimamente ligadas à diversidade dos microrganismos. Sabe-se ainda, que os microrganismos participam de processos ecológicos importantes como ciclagem de matéria orgânica, ciclos biogeoquímicos e manutenção da fertilidade e estruturas do solo.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Além da sua importância ecológica, os microrganismos tem grande utilidade para o homem em seu cotidiano. Algumas espécies de fungos, como o *Agaricus campestris* e o *Lentinus edodes*, conhecidos respectivamente como champignon e shitake, são amplamente utilizados na culinária, assim como outras espécies são utilizadas na fabricação de queijos, como o *Penicillium roqueforti*, utilizado na produção do queijo roquefort, e o *Penicillium camembertii*, utilizado na fabricação do queijo camembert. Já as leveduras, como o *Saccharomyces cerevisiae*, são empregadas na fabricação de alimentos como pães e bolos e também de bebidas alcoólicas, como a cerveja e o uísque. Fungos são também utilizados em produção de vinhos.

Além de serem importantes como decompositores, na indústria alimentícia e de bebidas, os fungos também utilizados na indústria farmacêutica, na produção de antibióticos como a penicilina, descoberta por Alexander Fleming no ano de 1929. chá como o produto do processamento de espécies vegetais (BRASIL, 2008), assim como a bebida obtida desses produtos por meio de infusão. Os chás são a segunda bebida mais ingerida no mundo, seu consumo perde somente para o consumo de água.

1.2 Bioquímica e fisiologia de microrganismos

Vários são os fatores de associações em que vivem os microrganismos como simbiose, antagonismo, sinergismo e metabiose; fatores inerentes ao meio de crescimento dos microrganismos (intrínsecos) e os fatores do ambiente externo ao meio de crescimento dos microrganismos (extrínsecos).

Simbiose: os microrganismos convivem harmonicamente. Em condições ideais para o crescimento de todos eles, há sempre uma predominância das bactérias sobre as leveduras e estas sobre os fungos.

Antagonismo: a presença de um determinado microrganismo inviabiliza a presença de outro.

Sinergismo: dois ou mais microrganismos em convívio simultâneo, apresentam suas funções metabólicas potencializadas.

Metabiose: ocorre uma predominância de um grupo de microrganismos que vão sendo, sucessivamente, substituídos em consequência da modificação progressiva do meio, ou seja, os metabólitos produzidos tornam-se tóxicos para um grupo, sendo ideal

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

para outro e, assim sucessivamente, até o esgotamento total de nutrientes, inviabilizando a vida.

O conhecimento dos fatores intrínsecos que agem sobre determinado substrato, permite prever sua estabilidade microbiológica, bem como conhecer a capacidade de crescimento e/ou a produção de enzimas/toxinas dos microrganismos eventualmente presentes. No entanto, o conhecimento de cada uma dessas características, isoladamente, é pouco útil devido aos efeitos interativos entre elas. Esses efeitos podem ser não apenas aditivos como também sinérgicos ou mesmo antagônicos. São considerados fatores intrínsecos a atividade de água, acidez (pH), presença de oxigênio ou dióxido de carbono, composição química do substrato, presença de fatores antimicrobianos naturais e as interações entre os microrganismos presentes nos meios utilizados.

A água em um substrato, conforme sua disponibilidade, é um dos fatores mais importantes no crescimento microbiano. A água pode ser considerada como um composto químico necessário para o crescimento e como participante da estrutura física do substrato. Os microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) necessitam de umidade para se desenvolverem, tendo o crescimento máximo atingido quando dispõem de água disponível.

Ela deve apresentar-se em condições de ser utilizada pelos micróbios, isto é, não combinada de forma alguma, como ocorre em certos solutos e colóides hidrofílicos. Água ligada a macromoléculas por forças físicas não está livre para agir como solvente ou para participar de reações químicas e, portanto, não pode ser aproveitada pelos microrganismos. Certos solutos, como sal e o açúcar, originam um aumento de pressão osmótica que tende a diminuir a quantidade de água disponível ao microrganismo. Em casos extremos, poderá ocorrer a plasmólise deste por causa do movimento da água no interior da célula para o meio exterior, com a finalidade de tentar igualar as concentrações. A umidade relativa do ar também interfere nesta relação, caso ela seja menor do que a umidade do substrato, este perderá umidade pela sua superfície e quando a umidade relativa do ar for maior, haverá adsorção de umidade pelo substrato.

Alguns microrganismos dependem da presença do oxigênio para toda sua via metabólica de degradação de fontes de carbono, sejam elas por glicólise, beta oxidação ou proteolítica, entrando nas vias de degradação de macromoléculas como forma de aproveitar melhor a energia presente no substrato.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

O pH e a temperatura ambiente também são determinantes para seu crescimento, pois interferem diretamente na funcionalidade das enzimas produzidas por estes microrganismos. Estas enzimas possuem uma faixa de pH e temperatura ótimas para poder interagir com o substrato e torná-lo disponível para este microrganismo. Fora desta faixa as enzimas podem desnaturar (perder sua funcionalidade) ou diminuir sua velocidade nas reações até níveis a produzir ATP insuficiente para a sobrevivência das células.

1.3 Identificação de fungos

A identificação dos fungos a nível de gênero é baseada exclusivamente em sua morfologia, tanto macro como microscopicamente. Macroscopicamente os fungos podem apresentar vários tipos morfológicos com colônias filamentosas, cotonosas, pulverulentas e outras (bolores) e cremosas (leveduras) e com os mais diversos tipos de pigmentos.

A unidade estrutural dos fungos é representada pela hifa e o conjunto desses elementos é denominado micélio. O micélio pode ser diferenciado em vegetativo, quando exerce as funções de assimilação de substratos, fixação em substratos e de formação de corpos de frutificação, que serve à reprodução destes fungos, sendo que o micélio vegetativo também pode se reproduzir. Os fungos têm como habitat, os mais diferentes substratos, sendo a grande maioria sobrevive no solo, fazendo parte da reciclagem dos materiais na natureza e como ciclo do Nitrogênio, também sendo encontrados nos vegetais, água, nos animais, etc.

Os fungos formam diversas estruturas de dispersão, sendo a principal, os esporos, e através de dispositivos especiais, essas estruturas entram em contato com várias vias de dispersão. A principal via de dispersão é o ar atmosférico, através dos ventos. Os fungos que se dispersam pelo ar atmosférico são denominados de fungos anemófilos e tem importância em alergias no homem e como agentes deteriorantes de diversos materiais. Os fungos podem se dispersar também pela água, sementes, insetos, homem, animais, etc. Pelas vias de dispersão, os fungos são espalhados na natureza. Quando encontram um substrato com nutrientes adequados, crescem e colonizam. Dessa maneira, podem deteriorar vários materiais e aparecer em vários hospedeiros.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

1.4 Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual de Maringá

No Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da UEM realizamos pesquisas buscando compreender as interações positivas dos microrganismos com o homem e o ambiente e assim explorá-las para fins ecológicos, nutricionais, medicinais e econômicos.

As pesquisas podem ser enquadradas nas seguintes áreas:

a)- Bioquímica de alimentos: isolamento, purificação e caracterização físico-química de compostos bioativos de microrganismos. Transformações dos alimentos pelos microrganismos.

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.

Publicações recentes:

INÁCIO, FABÍOLA DORNELES ; FERREIRA, ROSELENE OLIVEIRA ; ARAUJO, CAROLINE APARECIDA VAZ DE; PERALTA, ROSANE MARINA ; SOUZA, CRISTINA GIATTI MARQUES DE . Production of Enzymes and Biotransformation of Orange Waste by Oyster Mushroom, *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quéll..Advances in Microbiology, v. 05, p. 1-8, 2015.

SILVA, S. M. ; Koehnlein, E. A. ; BRACHT, A. ; Bracht, Adelar ; CASTOLDI, R. ; MORAIS, G. R. ; BAESSO, M. L. ; PERALTA, R. A. ; SOUZA, C. G. M. ; SANAKANISHI, A. B. ; PERALTA, R. M. Inhibition of salivary and pancreatic α -amylases by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. Food Research International, v. 56, p. 1-8, 2014.

b)- Bioquímica ambiental: biodegradação, bioacumulação e biorremediação de pesticidas e corantes sintéticos por microrganismos.

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. Na últimas décadas, a utilização dos fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de biorremediação vêm crescendo

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

em virtude do alto potencial degradativo, bioassortivo (metais pesados e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas.

Publicações recentes:

VIEIRA, A.C. ; MARSCHALK, C. ; BIAVATTI, D.C. ; LORSCHIEDER, C.A. ; PERALTA, ROSANE MARINA ; SEIXAS, F.A.V. .Modeling based structural insights into biodegradation of the herbicide diuron by laccase-1 from *Ceriporiopsis subvermispora*. *Bioinformation (Online) (Chennai)*, v. 11, p. 224-228, 2015.

GIMENEZ, GABRIELA GREGOLIN ; RUIZ, SUELEN PEREIRA ; CAETANO, WILKER ; PERALTA, ROSANE MARINA ; MATIOLI, GRACIETTE . Biosorption potential of synthetic dyes by heat-inactivated and live *Lentinusedodes* CCB-42 immobilized in loofa sponges. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* , v. 30, p. 3224-3229, 2014.

c)- Enzimologia aplicada: fungos ligninolíticos e agregação de valor a resíduos agro-industriais.

Biomassa num contexto biotecnológico pode ser definida como sendo toda a matéria orgânica produzida pela fotossíntese. A agroindústria é grande fornecedora de biomassa até agora não satisfatoriamente aproveitada, sendo responsável por grande parcela dos chamados rejeitos industriais. A elevada disponibilidade de fibras lignocelulósicas abre uma grande oportunidade para avanços tecnológicos que agreguem valor aos produtos da agroindústria. Por exemplo, a produção de álcool a partir dos resíduos lignocelulósicos.

Publicações recentes:

CORRÊA, RÚBIA CARVALHO GOMES ; RHODEN, SANDRO AUGUSTO ; MOTA, THATIANE RODRIGUES ; AZEVEDO, JOÃO LÚCIO ; PAMPHILE, JOÃO ALENCAR ; DE SOUZA, CRISTINA GIATTI MARQUES ; POLIZELI, MARIA DE LOURDES TEIXEIRA DE MORAES ; BRACHT, ADELAR ; PERALTA, ROSANE MARINA . Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 41, p. 1467-1478, 2014.

d)- Bioquímica das fermentações: pré-tratamentos biológicos de fibras e geração de açúcares fermentescíveis. Contribuições para as biorrefinarias.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

A biorefinaria a partir de materiais lignocelulósicos usa diferentes fontes de biomassa para a produção de uma série de produtos por meio de uma combinação de tecnologias. 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. 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 feruloilsterases, que removem fenólicos ligados aos carboidratos.

CASTOLDI, RAFAEL ; BRACHT, ADELAR ; DE MORAIS, GUTIERREZ RODRIGUEZ ; BAESSO, MAURO LUCIANO ; CORREA, RUBIA CARVALHO GOMES ; PERALTA, ROSELY APARECIDA ; MOREIRA, REGINA DE FÁTIMA PERALTA MUNIZ ; POLIZELI, MARIA DE LOURDES TEIXEIRA DE MORAES ; SOUZA, Cristina Giatti Marques de ; Peralta, Rosane Marina . Biological pretreatment of Eucalyptus grandis sawdust with white-rot fungi: study of degradation patterns and saccharification kinetics. Chemical Engineering Journal (1996) , v. 258, p. 240-246, 2014.

O Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da UEM é liderado pelas professoras Dr^a Rosane Marina Peralta e Dr^a Cristina Giatti Marques de Souza e possui alunos de diversos cursos de graduação (Ciências Biológicas, Bioquímica, Farmácia, Ciências de Alimentos, etc.) realizando estágios e pesquisas de iniciação científica e alunos de mestrado e doutorado dos programas de pós-graduação em Ciências Biológicas e em Ciências de Alimentos.

Os projetos são desenvolvidos com apoios financeiros de instituições como Fundação Araucária, CAPES e CNPQ e em associações com outras universidades do Brasil e também de outros países, como Portugal.

2. Materiais e Métodos

2.1 Isolamento

Através de métodos específicos, os fungos podem ser isolados de seu habitat, das vias de dispersão, dos vários materiais contaminados e de seus diversos hospedeiros.

O isolamento de fungos é uma etapa importante do trabalho em diversas áreas, onde o conhecimento do substrato/hospedeiro onde eles são encontrados permite deduzir que o microrganismo ali presente é capaz de crescer naquele substrato, possuindo em seu arsenal enzimático, ferramentas para seu desenvolvimento, e apresentando sintomas nestes.

Serão isolados fungos das amostras presentes no laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual de Maringá, através dos métodos direto e indireto.

2.1.1 Método direto

Materiais: espátula, 10 placas de petri contendo meio BDA estéril/Pentabiótico, água destilada estéril, álcool 70° e hipoclorito de sódio 1% e alça de repicagem.

As amostras deverão passar por um processo de desinfecção para retirada dos microrganismos oportunistas, embebidas por hipoclorito a 1% durante 1 minuto, retiradas e lavadas com água destilada esterilizada, então, embebidas por álcool 70° durante 30 segundos, passando novamente por uma lavagem em água destilada esterilizada. Transferir as amostras diretamente para o meio de cultura BDA e incubar em estufas a 28° C.

2.1.2 Método indireto

Materiais: alça de drigalski, espátula, 10 placas de petri com meio BDA estéril contendo Pentabiótico, 10 tubos de ensaio com 9 ml de água destilada esterilizada, 2 erlenmeyers contendo 100 ml de água destilada esterilizada e 10 pipetas esterilizadas.

Neste procedimento, suspender as amostras em erlenmeyer na proporção 1/1 peso/peso e agitadas durante 1 hora em agitador a 100 RPM para que as hifas e esporos presentes nas amostras se desprendam e permaneçam em suspensão. Então retirar 1 ml do sobrenadante de cada amostra e colocar em seus respectivos tubos de ensaio contendo 9 ml de água destilada e agitar durante 30 segundos para atingir diluição 1/10.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Repetir o procedimento para cada amostra/diluição até atingir a diluição 10⁻⁵ em cada amostra, então retirar 10 µL das diluições 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ de cada amostra, sendo distribuídos uniformemente para que estes 10 µL preencham toda a superfície das placas de meio BDA estéril contendo antibiótico Pentabiótico, posteriormente incubar em estufas a 28° C.

As avaliações das placas deverão acontecer diariamente para identificação de aparecimento de hifas e estruturas reprodutivas.

Em caso de presença de mais de um isolado por placa, serão necessárias repicagens sucessivas, em meio BDA estéril contendo Pentabiótico, de cada um dos isolados, até obtenção de culturas puras para posterior avaliação.

As avaliações microscópicas deverão ser realizadas com preparação de laminais através de microcultivo de cada um dos isolados para posterior observação de estruturas vegetativas e reprodutivas dos fungos, em diferentes aumentos, no microscópio óptico.

Resultados esperados: Como resultados esperamos encontrar cepas de fungos presentes na natureza, nos mais diferentes substratos, que possam ter aplicabilidade em procedimentos bioquímicos e biotecnológicos.

2.2 Cultivo e extração enzimática de fungos basidiomicetos

Fungos são produtores de diversas enzimas de interesse biotecnológico, como exemplos temos a celulase, utilizada na indústria de tecidos, as proteases e lipases, utilizadas para a produção de detergentes, amilases e pectinases, utilizadas na indústria de alimentos, entre outras. Assim, a identificação de fungos com potencial para a produção destas enzimas de forma econômica e eficiente é uma necessidade.

2.2.1 Cultivo estado sólido

Substrato 1: 3,5 g de bagaço de laranja, 1,0 g de farelo de trigo, 2,0 g de amido, 0,2 g de extrato de levedura.

Substrato 2: 3,5 g de casca de maracujá, 1,0 g de farelo de trigo, 2,0 g de amido, 0,2 g de extrato de levedura.

Em um frasco erlenmeyer de 125 ml colocar o substrato e umedecer com solução

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

mineral Vogel até que se alcance 80 % de umidade. Vedar os frascos e autoclavar por 15 min a 121 °C.

Inocular dois discos de ágar com micélio (7 dias, \varnothing 15 mm) por erlenmeyer e incubar a 28 °C no escuro por 14 dias.

2.2.2 Extração enzimática

Interromper o cultivo acrescentando 20 ml de água autoclavada gelada, macerar e filtrar com gaze. Em seguida centrifugar por 10 min (8.000 rpm). O sobrenadante será considerado como extrato bruto enzimático para posteriores análises.

2.3 Cup plate e dosagem enzimática

2.3.1 Ensaio qualitativo cup plate para detecção de enzimas

Preparar os meios abaixo:

- a) Amilase: ágar-amido (18g/L^{-1} de ágar, 10g/L^{-1} de amido, tampão citrato-fosfato, 0,1 M, pH 5,0);
 - b) Celulase: ágar CMC (18g/L^{-1} de ágar, 10g/L^{-1} de carboximetilcelulose, tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 5,0);
 - c) Pectinase: ágar-pectina (18g/L^{-1} de ágar, 10g/L^{-1} de pectina, tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 5,0);
 - d) Fenoloxidase: ágar-ácido tânico (18g/L^{-1} de ágar, 5% de ácido tânico, tampão citrato-fosfato, 0,1 M, pH 5,0);
- 3) Após o ágar solidificar, perfurar poços de 6mm de diâmetro em sua superfície.
 - 4) Adicionar 100 μ l do filtrado do cultivo nos poços das placas.
 - 5) Incubar por 24h a 28°C.
 - 6) Análise das placas:
 - a) **Amilase** (ágar-amido): colocar sobre a placa quantidade suficiente para cobri-la de iodo a 0,1M. Observar a formação de halo translúcido ao redor dos poços e a parte não afetada corada em azul. Medi-los anotando os valores em mm.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

b) **Celulase** (ágar CMC): colocar sobre a placa quantidade suficiente para cobri-lade Vermelho do Congo 0,1%. Observar a formação de halo claros ao redor dos poços, revelando a ação enzimática da celulase, enquanto a parte não afetada cora-se em vermelho. Medi-los anotando os valores em mm.

c) **Pectinase** (ágar-pectina): colocar sobre a placa quantidade suficiente para cobri-lade ácido clorídrico 5N. Observar a formação de halo opaco ao redor do poço. Medi-los anotando os valores em mm.

d) **Fenoloxidase** (ágar-ácido tânico): Não é necessário uso de revelador. Observar a formação de halo de coloração marrom, resultado da oxidação do ácido tânico pelas enzimas fenoloxidase (lacase, manganês-peroxidases e lignina-peroxidases). Medi-los anotando os valores em mm.

2.3.2 Atividade α -amilase pancreática

1. Utilizar tampão fosfato 20 mM/L, pH 6,9, contendo 6,7 mmol/L de NaCl.
2. Preparar amido a 2%:
3. Pesar 0,5 g de amido “Sigma” dissolver em 20 ml de tampão fosfato de sódio. Aquecer por 5 min ou até observar a mudança de fase (Opaco para translúcido). Resfriar em temperatura ambiente. E assim que esfriar colocar em um balão de 25 mL e acertar com tampão até 25 mL.
4. Preparar diferentes concentrações de amido dissolvido em tampão:

Tubos	[g% amido]	Vol. Amido 2% (mL)	Vol. Tampão 20mM	Vol.Total da solução (mL)	[%final amido]
1	0,2	0,25	2,25	2,5	0,05
2	0,4	0,5	2,00	2,5	0,10
3	0,6	0,75	1,75	2,5	0,15
4	0,8	1,0	1,5	2,5	0,20
5	1,0	1,25	1,25	2,5	0,25
6	1,2	1,5	1,0	2,5	0,30
7	1,6	2,0	0,5	2,5	0,40
8	2,0	2,5	-	2,5	0,50

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

5. Preparar a enzima alfa-amilase pancreática

Pesar 0,01 g de enzima

Dissolver em 8 mL de tampão fosfato de sódio (GELADO) em um balão volumétrico completar o volume para 10 mL.

Diluir a enzima 1:40.

1º ETAPA – De cada padrão (diferentes concentrações de amido)

0,5 mL da solução de amido

0,25 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM

Incubar a 37°C em banho-maria por 5 minutos.

Após 5 minutos: pipetar 250 µL de enzima da enzima diluída no tubo da mistura.

Imediatamente coletar 250 µL da mistura (amido+ tampão + enzima) e pipetar para o outro tubo que contém:

250 µL de DNS(esse será o branco – tempo zero)

Deixar todos os tubos incubados por 10 min.

2º ETAPA

Ao término de 10 min. Em duplicata pipetar

250 µL da mistura (amido +tampão+enzima) para os tubos que contém o 250 µL de DNS

Ferver os tubos de ensaio por 5 min. Resfriar a temperatura ambiente e adicionar 2,5 mL de água. Homogeneizar em Vortex

Ler a 540 nm

2.3.3 Dosagem de lacase pelo método de ABTS

Em um tubo de ensaio acrescentar:

1,7 ml de tampão acetato de sódio (50 mM) pH 5,0

200 ul de ABTS (10 mM)

100 ul de amostra

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Incubar por 5 min em banho maria a 40°C e ler a absorbância a 420 nm contra o branco (1,8 ml de tampão + 200 ul de ABTS)

Atividade enzimática = ABS x fator x diluição

Fator= 111

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DEACON, J. Fungal Biology. Blackwell Publishing, 4th.Edition, 2006.

HERNÁNDEZ MS, Rodríguez MR, Guerra NP, Rosés RP. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *J Food Eng* 2006;73:93–100.

PELÁEZ F, Martínez MJ, Martínez AT. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol Res* 1995;99:37–42.

SOUZA, H. Q.; de Oliveira, L. A.; Andrade, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 28 (supl.):116-124, dez. 2008.

Minicurso 09

Estudo do Sistema Nervoso Entérico em Diferentes Modelos Experimentais

Laboratório de Histotécnica Animal (Bloco H76/sala 105)

Orientadora: Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali

Ministrantes: Ana Paula de Santi Rampazzo, Carlos Vinicius Dalto da Rosa, Debora dos Anjos Weber Luz, Larissa Lauer Schineider, Lia Mara Teobaldo Tironi, Stephanie Carvalho Borges e Taiana Ferreira Varela

INTRODUÇÃO

1. TRATO GASTRINTESTINAL E SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE)

O sistema digestório consiste em cavidade oral, esôfago, estômago, intestinos delgado e grosso, e glândulas associadas: salivares, fígado e pâncreas, além da vesícula biliar. Este sistema tem a função de obter dos nutrientes ingeridos as moléculas necessárias para manutenção, crescimento e demais necessidades energéticas dos organismos (Junqueira e Carneiro, 2011). 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 túnica são semelhantes em toda extensão do trato gastrintestinal, 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

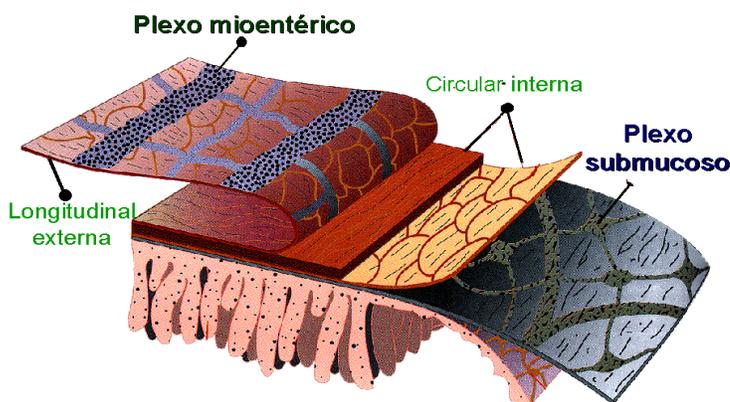
Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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).



Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 intestinal 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).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 ou mal funcionamento 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 (Rees 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-nitrosuréia, 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 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) e/ou também

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

2.3. Isquemia/Reperusão Intestinal

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 reperfusão (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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 reperfusão (Bulkley, 1987) 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 (EROs) 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; Lindestro e Elblad, 2004). As alterações funcionais dos neurônios entéricos levam, então, à alterações na motilidade intestinal (Calcina et al., 2005; Lindestro e Elblad, 2004).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015



2.4. 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., 1996). Promove alterações morfoquantitativas na população neuronal e glial entérica (Phillips et al., 2004; Marese et al., 2007), na expressão de neurotransmissores (Phillips et al., 2004) 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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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. Em outro estudo (Santi-Rampazzo et al., 2015), 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.

2.5. 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).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 em nosso laboratório: *Ginkgo biloba* (Schneider et al., 2007; Perez et al., 2009; Da Silva et al., 2011), Vitaminas C (De Freitas et al., 2008) e Vitamina E (Pereira et al., 2008), L-Glutamina (Pereira et al., 2011), extrato aquoso do cogumelo-do-sol, *Agaricus brasiliensis* (Antigo *A. blazei*) (Santi-Rampazzo et al., 2015) e resveratrol (Borges, 2013). Vale ressaltar que os modelos utilizados possuem particularidades em relação à tratamento e forma de administração do antioxidante estudado.

2.6. *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii*, um parasita intracelular causador da Toxoplasmose, é um protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse Coccidia (Ascenzi et al., 2005). Esse protozoário é considerado um dos mais bem sucedidos parasitas da terra. Sua prevalência na população humana ao redor do mundo varia entre 10 e 90% (Dubey e Beattie, 1988).

O ser humano, infectado pelo *Toxoplasma gondii*, geralmente permanece assintomático ou desenvolve sintomas leves (Ambroise-Thomax e Pelloux, 1993; Ascenzi et al., 2005), como: linfadenopatia (Ridley, 2012), febre e coriorrenite (Hakes e Armstrong, 1983). Porém, quando mulheres grávidas ou pessoas imunodeficientes são infectadas pelo *T. gondii*, podem ocorrer consequências severas (Bowie, 1997; Ambroise-Thomax e Pelloux, 1993) como: hepatite, pneumonia, cegueira, encefalites e abscessos cerebrais em pacientes imunodeprimidos (Ascenzi et al., 2005; Hakes e Armstrong, 1983), e nas mulheres grávidas pode causar danos ao desenvolvimento do feto como malformações encefálicas (Figueiró-Filho et al., 2005) ou aborto espontâneo (Ascenzi et al., 2005).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Sua transmissão pode ocorrer quando os hospedeiros ingerem cistos teciduais presentes na carne mal cozida, água e comida contaminada com oocistos e através de transmissão vertical de taquizoítos (Fayer, 2004; Ascenzi *et al.*, 2005).

Quando oocistos esporulados são ingeridos por qualquer vertebrado homeotermo, os parasitas penetram na mucosa intestinal. A presença desses parasitas na mucosa intestinal pode causar enterite, com edema, necrose da lâmina própria e descamação da mucosa (Dubey, 2004).

Porém após infecção por *T. gondii*, quando ocorre a invasão da parede intestinal pelas formas infectantes do parasita, o sistema nervoso entérico pode ser comprometido e sofrer alterações neuronais. São citadas na literatura alterações como: redução no número de neurônios (Sant'Ana et al., 2012), alteração no tamanho do corpo celular de neurônios (Soares et al., 2009; Sant'Ana et al., 2012; Hermes-Uliana et al., 2011) e no citoplasma neuronal (Papazian-Cabanaset al., 2012).

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 arranjados 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

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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 (antiseros) 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.

2. Anticorpos

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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

3. 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:

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

- 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).

4. 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 epítomos de um antígeno contra o qual são dirigidos.

5. 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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

Métodos de Coloração

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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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 do que o método direto, porque alguns anticorpos secundários parecem reagir com diferentes epítomos 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 seqüencialmente, 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 epítomos.

Coloração Inespecífica de Fundo

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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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-imuneda** 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

Imunohistoquímica

Coleta de Material:

Retirar o segmento de interesse

Lavagem do segmento – PBS (phosphate buffered saline/tampão fosfato salinado)

Fixação: Paraformaldeído- 3 hrs

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

Manter o material em PBS com azida sódica (0,08%) para posterior dissecação.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

Dissecção

Após a dissecção, manter as membranas em PBS com azida.

Realizar a primeira lavagem (2x 500 μ L por 5 min) em PBS + detergente*
Triton X-100 (0,05%)

*O detergente desestabiliza e gera buracos na membrana plasmática (bicamada lipídica) que permitem melhor fluxo de substâncias, como os anticorpos, para dentro da célula.

Bloqueio

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

Solução: PBS + azida + Triton + soro de cabra 20% + albumina de soro bovino (BSA) 10%.

Anticorpo Primário:

Incubar em anticorpo primário por 48 hrs.

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

Anticorpo Secundário:

Realizar a segunda lavagem – (3 x 500 μ L por 5 min) em PBS + Triton

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

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

Montagem das lâminas:

Após a terceira lavagem em PBS (3 x 500 μ L 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 morfométrica*, 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.

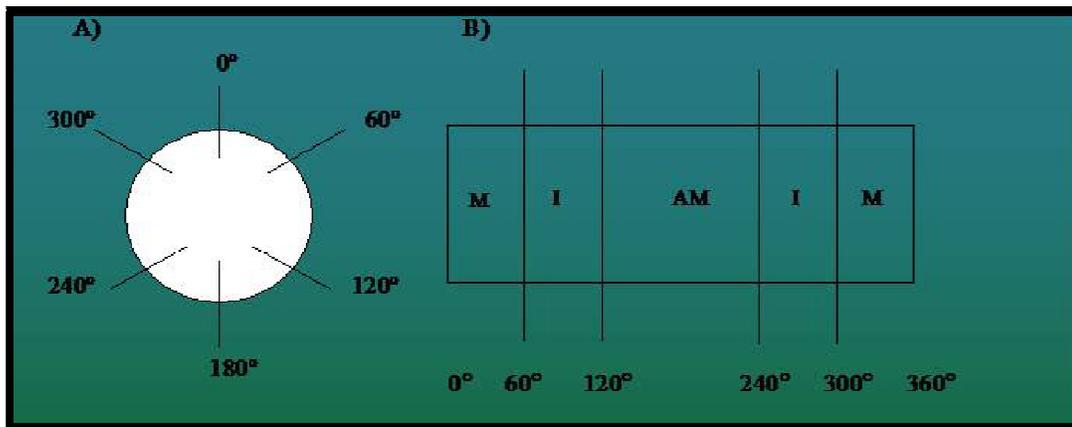


Figura 1. Divisão didática da circunferência intestinal.

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 lente objetiva utilizada para análise é de 20X, utilizam-se geralmente 32 campos microscópicos, 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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

para todos os animais. A região mesentérica (M) é pouco utilizada por sofrer injúrias durante o processamento, tornando a visualização celular mais difícil. Após a captura das imagens realiza-se a contagem de todos os neurônios, obtendo-se uma soma que, juntamente com a 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 glia/gânglio. No caso de dupla-imunomarcagem para neurônios e células da glia, os resultados podem ainda ser expressos como relação glia/neurônio.

Para a análise morfológica são mensuradas áreas (μm^2) dos corpos celulares de 100 neurônios ou células gliais/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) por meio do teste Kolmogorov-Smirnov (KS). Dados paramétricos (distribuição normal) são submetidos à Análise de Variância (*one-way* ANOVA) e 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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AMBROISE-THOMAX E PELLOUX Toxoplasmosis- Congenital and in Immunocompromised Patients: A Parallel. **Parasitology Today**; 9: 61-3, 1993.

ASCENZI, P.; BOCEDI, A.; GRADONI, L. Do Neuroglobin and Myoglobin Protect *Toxoplasma gondii* from Nitrosative Stress? **IUBMB Life**; 57: 689-91, 2005.

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

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.

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.

BORGES, SC. **Resveratrol promove neuroproteção em neurônios mientéricos do íleo de ratos após injúria por isquemia e reperfusão**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2013.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

BOWIE, WR.; KING, AS.; WERKER, DH.; ISAAC-RENTON, JL.; BELL, A.; ENG, SB.; MARION, SA.; Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **The Lancet**;350:173-77, 1997.

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.

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.

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.

DUBEY, JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**; 26: 57-72, 2004.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

DUBEY, JP., BEATTIE, CP. Toxoplasmosis in man (*Homo sapiens*). *Toxoplasmosis of Animals and Man*. 2 ed. CRC Press, 41-60 p. 1988.

FAYER, R.; DUBEY, JP.; LINDSAY, DS. Zoonotic Protozoa: from land to sea. **Trends in parasitology**; 20: 531-6, November 2004.

FIGUEIRÓ- FILHO EA, LOPES AHA, SENEFONRE FRA, JUNIOR VGSJ, BOTELHO CA, FRENCKEL JK. Toxoplasmose. In: Veronesi R, editor. Tratado de infectologia. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2002. p. 1310-25.

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

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.

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.

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

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

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

HAKES, EB.; ARMSTRONG, D. Toxoplasmosis problems in diagnosis and treatment. **Cancer**; 52: 1535-40, 1983.

HERMES-ULIANA, C.; PEREIRA-SEVERI, L. S.; LUERDES, R. B.; FRANCO, C. L. M ; SILVA, A. V. da; ARAÚJO, E. J. de A.; SANT'ANA, D. de M. G. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* causes myenteric neuroplasticity of the jejunum in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**; 160: 3–8, 2011.

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.

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

PAPAZIAN-CABANAS RM., ARAÚJO EJ., SILVA AV. DA., SANT'ANA D. DE MD. Myenteric neuronal plasticity induced by *Toxoplasma gondii* (genotype III) on the duodenum of rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**; 84: 737-745, 2012.

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

PEREZ, GG; SCHNEIDER, LCL; BUTTOW, NC. Ginkgo biloba extract (EGb 761): effects on the myenteric plexus of The large intestine in Wistar rats. **Dig. Dis. Sci.** 54: 232-237, 2009.

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.

RIDLEY, JW. *Toxoplasma* spp., Toxoplasmosis, and Infections Caused by Related Organisms. In: **Parasitology for Medical and Clinical Laboratory Professionals**. 1 ed. cap. 4 Delmar Cengage Learning, New York, 2012.

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.

SANT'ANA, D. de MG.; GÓIS, MB.; ZANONI, JN.; SILVA, AV. da; SILVA, CJT. da; ARAÚJO, EJ. de A. Intraepithelial lymphocytes, goblet cells and VIP-IR submucosal neurons of jejunum rats infected with *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Exp. Path**, 93: 279-86, 2012.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

SCHNEIDER, LCL; PEREZ, GG; BANZI, SR; ZANONI, JN; NATALI, MRM; BUTTOW, NC. Evaluation of the effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on the myenteric plexus of the small intestine of Wistar rats. **J. Gastroenterol.**, 42: 624-630, 2007.

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

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.

SOARES, J.; MOREIRA, NM.; SILVA, AV. da; SANT'ANA, D. de MG.; ARAÚJO, EJ. de A. Infecção crônica por *Toxoplasma gondii* induzindo hipertrofia de neurônios do plexo mientérico do cólon descendente de *Rattus norvegicus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 18: 57-60, 2009.

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

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.

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

Minicurso 10

Origem da Saúde e Doença em Fases Críticas do Desenvolvimento: Influências do Ambiente Perinatal na Vida Adulta

Laboratório de Biologia Celular da Secreção (Bloco H67/sala 19)

Orientadores: Profa. Dra. Marialba A. Alves Castro Padro e Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias

Ministrantes: Audrei Pavanello, Flávio Andrade Francisco, Kelly Valerio Prates, Laize Peron Tófolo, Rosiane Aparecida Miranda, Vander Silva e Veridiana Mota Moreira

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 triacilglicerois 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 America (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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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).

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 glutamato monossódico (MSG) durante os primeiros dias de vida do animal (Olney, 1969, Nascimento Curi *et al.*, 1991), os modelos por indução através de dietas rica em gorduras (Howard, 2002, Prada *et al.*, 2006) e por uma programação metabólica pós-parto através da superalimentação da prole por reduzir o tamanho normal da ninhada (Davidowa, 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

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

pela vagotomia bilateral subdiafragmática. Assim como a resistência à insulina (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 e controle glicêmico, os quais são parâmetros metabólicos classicamente alterados em indivíduos obesos.

Objetivo

Discutir mecanismos fisiopatológicos da origem da saúde e doença em fases críticas do desenvolvimento com ênfase nas influências do ambiente perinatal na vida adulta.

Metodologia

O curso oferecerá práticas experimentais utilizando ratos Wistar adultos (80 a 90 dias de vida), obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular. 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. Indução de obesidade em modelos animais

1.1 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.

2 Procedimentos Cirúrgicos para Estudar o Envolvimento do SNA

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

2.1 Canulação da veia jugular:

Essa cirurgia implica no implante de uma cânula de silicone na veia jugular externa direita em ratos sob efeito da mistura anestésica quetamina/xilasina (3 + 0,6mg/100g de 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 a glicose intravenosa (ivGTT).

2.2 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 1g/Kg de peso corporal do animal. Aos 5, 15, 30 e 45 min serão colhidas amostras de sangue que serão posteriormente dosadas.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

2.2.1 Dosagem dos níveis de glicose plasmática

A determinação dos níveis plasmáticos de glicose será realizada em alíquotas de plasma (10 µL), por meio da utilização de método enzimático colorimétrico da glicose-oxidase por meio de espectrofotometria (Analisador bioquímico semiautomático, BIO 200FL, Bio Plus[®], São Paulo/SP, Brasil), utilizando kit comercial (Gold Analisa[®], Belo Horizonte/MG, Brasil). Os resultados serão expressos em mg/dL.

2.3 Isolamento de Ilhotas Pancreáticas

O isolamento de ilhotas pancreáticas se dará pela técnica de digestão do pâncreas com colagenase. No mínimo, 3 animais por grupo serão usados para se isolar as ilhotas. Para testar a capacidade secretora das ilhotas, estas serão colocadas em placas para cultura de células, (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; CaCl₂2H₂O, 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; 20,0 ou 24,0], e então novamente serão incubadas por mais 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.

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.

Apostila de Minicursos
V Curso de Inverno em Biologia Celular e Molecular
27 a 31 de Julho de 2015

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.