

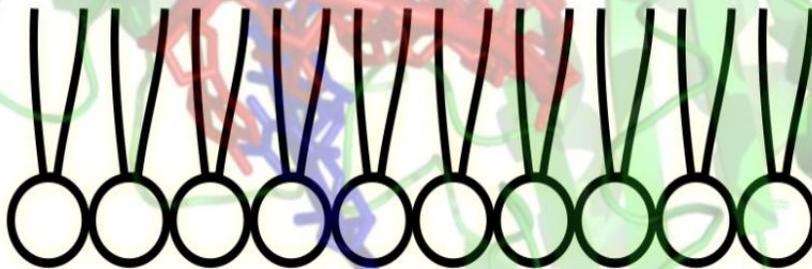


**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*



*15 a 18 de Julho de 2014*

## SUMARIO

**Minicurso 1:** Bicho-da-seda como modelo de estudos genéticos e moleculares

**Minicurso 2:** Identificação e clonagem do gene da proteína kin17

**Minicurso 3:** Produção de etanol de segunda geração

**Minicurso 4:** Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no Brasil

**Minicurso 5:** Técnicas para avaliação da sensibilidade aos inseticidas e análise genética-bioquímica em insetos-praga

**Minicurso 6:** Atividade antimicrobiana de compostos sintéticos

**Minicurso 7:** Modelos experimentais para estudo do sistema nervoso entérico

**Minicurso 9:** Citogenética de peixes: conceitos e aplicações

**Minicurso 10:** Homeopatia em vegetais

**Minicurso 11:** Atividade de mitocôndrias animal e vegetal

**Minicurso 12:** Técnicas de perfusão hepática e estresse oxidativo em ratos

**Minicurso 13:** Estudo da genotoxicidade de fármacos e de produtos naturais através de testes *in vivo* e *in vitro*

**Minicurso 15:** Mecanismos de ação de agroquímicos: ensaios laboratoriais.

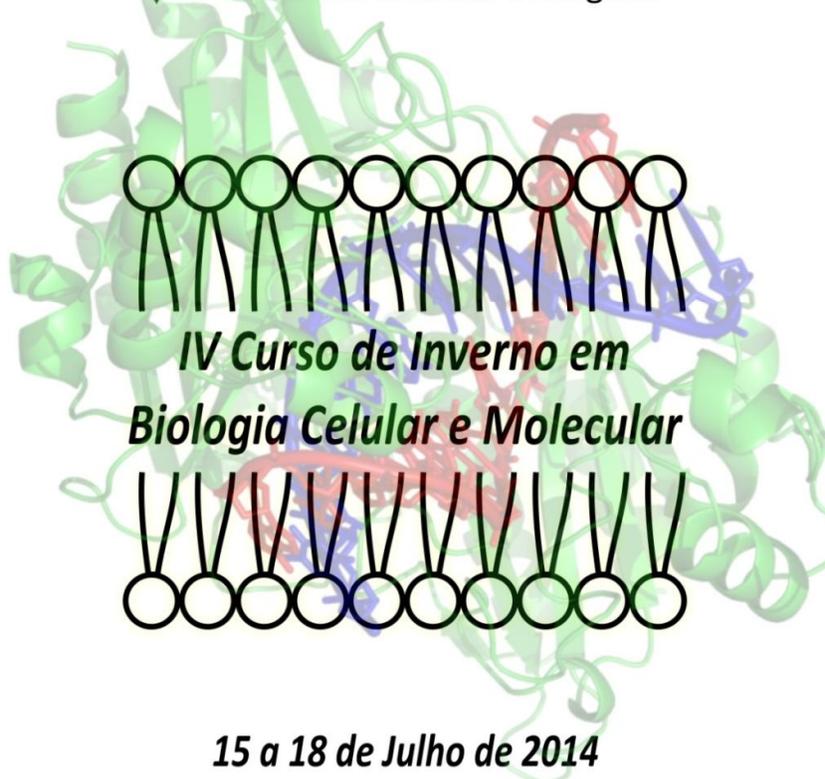
# MINICURSO 1

## BICHO-DA-SEDA COMO MODELO DE ESTUDOS GENÉTICOS E MOLECULARES



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



**LABORATÓRIO DE MELHORAMENTO GENÉTICO DO BICHO-  
DA-SEDA**

**Professores:**

Maria Aparecida Fernandez

**Pós-graduandos:**

Roxelle Ethienne Ferreira Munhoz

Alana Lucia Oro

Cláudia Regina Saez

Verônica Fassina

Alex Sandro Chiarello

Graziele Pessini

## Introdução

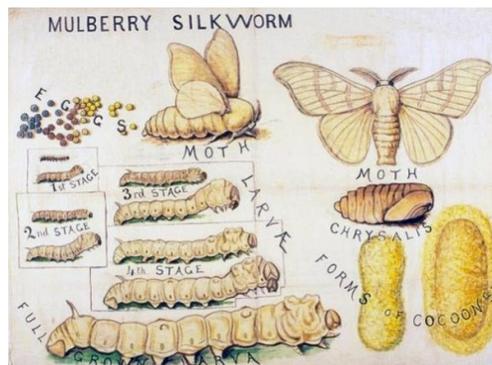
### 1. Bicho-da-seda

*Bombyx mori* foi descrito por Linnaeus em 1758, pertence ao reino Animalia, filo Artropoda, classe Insecta, ordem Lepidoptera, família Bombycidae, gênero *Bombyx*. O bicho-da-seda é, juntamente com a abelha, o único inseto domesticado com finalidade comercial.

A espécie domesticada de *B. mori* foi propagada em larga escala e utilizada para a produção de seda na China, Japão e Europa, chegando ao Brasil apenas no ano de 1.740. Devido ao seu antigo processo de domesticação, as lagartas não conseguem se alimentar em seu ambiente natural, necessitando que o alimento seja fornecido pelo homem. As mariposas de *B. mori* apresentam asas e aparelho digestório degenerados e não podem mais voar ou se alimentar, ou seja, esta espécie é totalmente dependente do homem, o que caracteriza a completa domesticação (Munhoz, 2010).

#### 1.1 Ciclo de Vida

O bicho-da-seda é um inseto holometábolo, ou seja, apresenta metamorfose completa, sendo o inseto jovem completamente diferente do inseto adulto. Este inseto passa por quatro estágios no seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e mariposa. A mariposa desova entre 400 e 500 pequenos ovos, que se transformam em pequenas larvas de cerca de 1mm de comprimento, as quais se alimentam de folhas de amoreira para o desenvolvimento, tendo 4 mudas no total. Quando as larvas atingem o tamanho máximo de 70 a 80 mm de comprimento, em cerca de 30 dias, passam a produzir os casulos verdes. Dentro do casulo, a larva se transforma em crisálida e com 10 ou 12 dias se transforma em mariposa. Na fase adulta do inseto, como mariposa pode-se verificar o dimorfismo sexual, sendo que as fêmeas são significativamente maiores que os machos.



## **1.2 Sericicultura**

A sericicultura é a atividade agropecuária de criação do bicho-da-seda para obtenção de casulos destinados à produção de seda. Esta atividade inclui o cultivo da amoreira, a produção dos ovos do bicho-da-seda, criação das lagartas até a produção dos casulos e, finalmente, fiação e confecção da seda por parte do setor industrial. No Brasil as condições climáticas são favoráveis ao cultivo tanto da amoreira quanto do inseto, fazendo com que a produção de casulos seja considerada uma boa alternativa para os produtores (Fernandez et al., 2005).

A China foi a primeira civilização a utilizar a seda, controlando o ciclo do bicho-da-seda, alimentando-o com folhas de amoreira e matando os adultos antes de nascerem, além de se conhecer as técnicas do bobinamento dos filamentos, tecendo-os em fios resistentes que, posteriormente, eram usados para a confecção de tecidos. A sericicultura tornou-se um importante fator para a globalização, por aproximadamente 2.000 anos, a chamada “Era da Rota da Seda” (Kurin, 2002). No século XVIII, o Imperador D. Pedro I, fundou a primeira indústria de tecelagem da seda no Brasil e em 1921 estabeleceu-se em Campinas no Estado de São Paulo a Indústria de Seda Nacional. Mas foi a segunda Guerra Mundial que favoreceu o desenvolvimento da sericicultura.

As indústrias de fiação do Brasil distribuem mudas de amoreiras e lagartas do bicho-da-seda no 3º estágio de desenvolvimento larval para os produtores que cultivam as lagartas até a fase de casulos, os quais são vendidos ao setor empresarial. Portanto, a atividade da sericicultura proporciona importantes aspectos sócio-econômicos: é uma cultura alternativa, gera produto de exportação, fixa o homem no campo, apresenta pouca dependência climática, tem pequeno custo de produção, além da racionalização da mão-de-obra. O Estado do Paraná, nos últimos 10 anos, destacou-se como o maior produtor nacional de casulos verdes.

## **1.3 *Bombyx mori* como modelo de estudo biológico**

O bicho-da-seda tem sido muito utilizado como um sistema modelo para estudos devido ao grande tamanho de seu corpo, a facilidade de criação em laboratório e importância econômica na sericicultura. Esta espécie facilita os estudos de genômica comparativa levando a abordagens para controle de espécies de pragas (Mita et al., 2004).

### **1.3.1 *Diversidade das Raças***

São inúmeras as raças de bicho-da-seda com origem geográficas de domesticação diferentes, sendo as mais conhecidas e empregadas às raças

japonesas, européias e chinesas. É geralmente aceito que *Bombyx mandarina* é o ancestral selvagem mais próximo de *B. mori* sendo ambos morfologicamente e fisiologicamente similares. *Bombyx mandarina*, de ocorrência no Japão e Coréia tem 27 cromossomos, enquanto que *B. mandarina*, da China apresenta 28 cromossomos, assim como o domesticado *B. mori*. Os dois tipos selvagens, *B. mandarina* da China e do Japão, possuem morfologia homogênea e número de cromossomos diferentes por genoma. Com o avanço do melhoramento genético, e com o emprego de seleções e cruzamentos conduzidos, através de muitos anos, várias outras raças apareceram, estimando-se que a espécie sofreu mais de quatrocentas mutações.

### **1.3.2 Melhoramento Genético**

É importante avaliar e escolher as raças bases “progenitores” ou “matrizes” nos programas de criação de híbridos, para se obter alguma melhoria na produção de seda. A exploração dos efeitos benéficos proporcionados pelo processo de hibridização, também conhecido como vigor híbrido, é bem conhecida na Sericultura. Quando se deseja realizar a hibridação, é importante que o acasalamento seja conduzido entre duas ou quatro raças puras, em híbridos simples ou duplos, respectivamente. Para garantia de tratar-se de raças puras, é necessário forçar o aumento de homozigose nas descendências transformando-as em linhagens endogâmicas. A endogamia permite expor nas progênes resultantes os genes deletérios ou letais escondidos na condição heterozigota. Desse modo pode-se fazer seleção contra eles.

A utilização da heterose é uma estratégia que gera variabilidade por hibridização de genótipos elites com outras variedades selecionadas ou variedades locais, direcionando para a seleção de recombinações genéticas desejáveis. Os atributos qualitativos e quantitativos intrínsecos de cada raça ou linhagens, são normalmente estudados, visando selecionar os melhores para programas de melhoramento e formação de híbridos (PORTO et al., 2004).

No Brasil, este trabalho tem sido realizado por meio de órgãos oficiais e de empresas particulares, nos quais grande número de estudos foram conduzidos, objetivando comparar as várias raças do bicho-da-seda, bem como seus híbridos, quando às suas características desejáveis. Atualmente a formação e distribuição dos híbridos comerciais do bicho-da-seda ficou restrita às empresas privadas que atuam no setor, seguindo um modelo integrado de produção empresa/produtor (PORTO et al., 2004). Por este fato é que se torna de fundamental importância a manutenção de estoques genéticos desta espécie em bancos de germoplasma localizados em

institutos públicos e privados distribuídos pelo mundo. Além de fazer a conservação, os bancos também realizam a caracterização e avaliação dos genótipos.

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

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

## **2. Variabilidade genética**

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

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

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

## 2.1 Marcadores de DNA

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

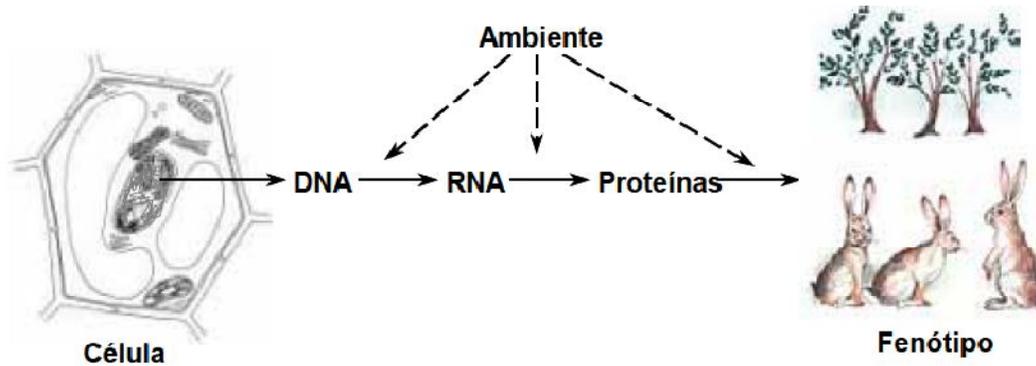


Fig. 1. Dogma Central da biologia molecular, evidenciando a influência direta do DNA no fenótipo.

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

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

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

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

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

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

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

Podemos ainda classificar os marcadores moleculares de acordo com a sua base genética, sendo que o marcador é codominante quando os cromossomos homólogos podem revelar fragmentos de um mesmo tamanho (genótipo homocigótico)

ou não (genótipo heterozigótico) devido a variações nos sítios de restrição. Já no caso de marcadores dominantes, não é possível saber se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. Os indivíduos nos quais o alelo não é amplificado constituem a outra classe, considerada homozigótica para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado.

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

## ***2.2 PCR - Polymerase Chain Reaction ou Reação da Polimerase em Cadeia***

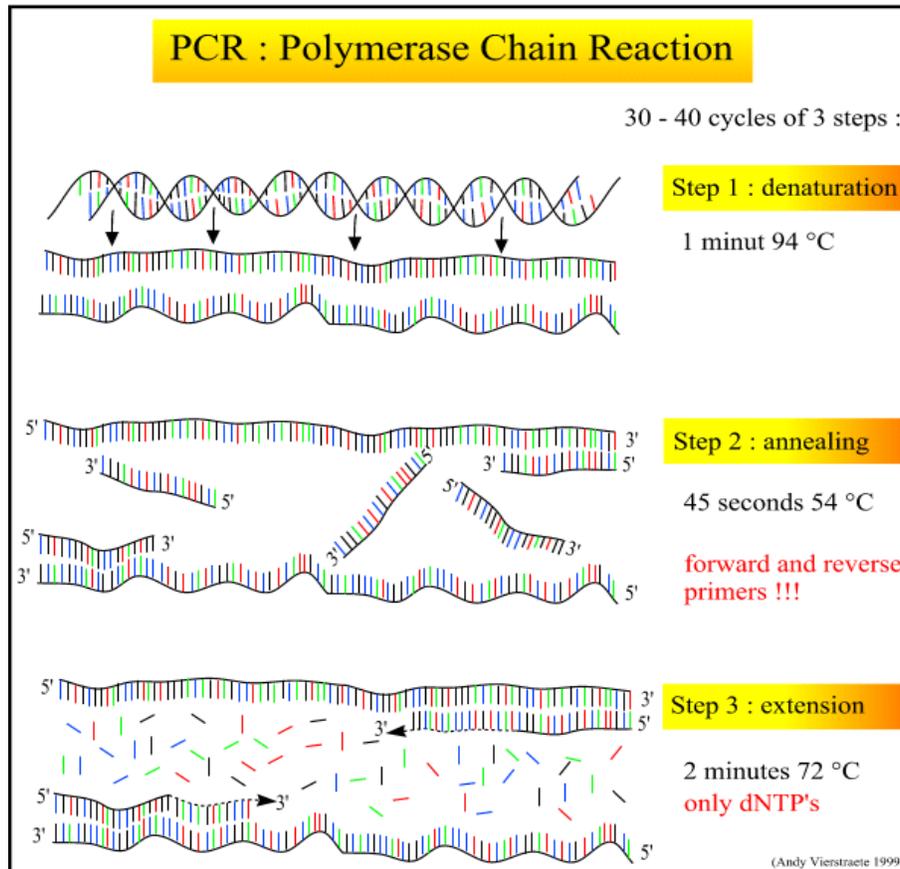
A tecnologia da PCR foi concebida em meados da década de 80 (Mullis e Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985). Desde então esta tecnologia causou uma revolução na biologia, na pesquisa visando o entendimento de processos biológicos fundamentais como nas áreas de melhoramento genético de plantas e animais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

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

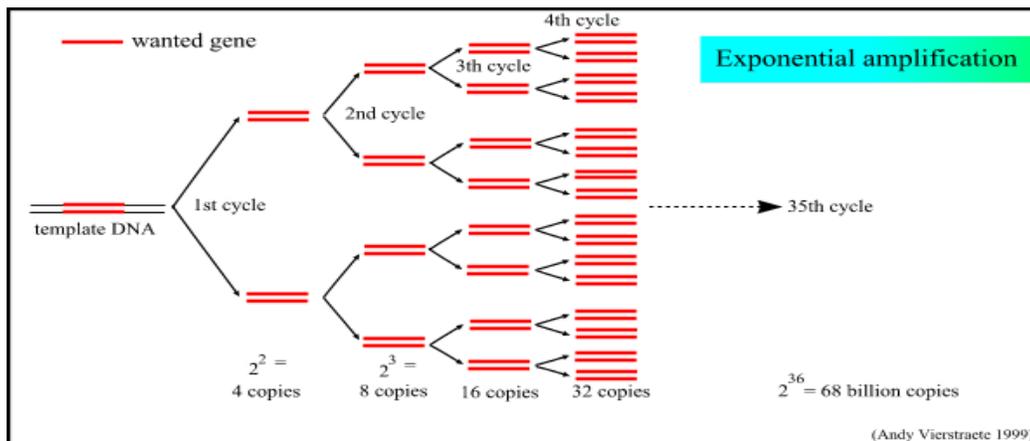


**Fig. 2.** Termociclador.

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



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



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

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

### 2.3 DNA barcode

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

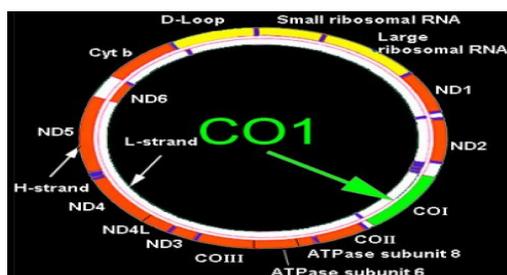


Figura 5. DNA mitocondrial, evidenciando a região do gene citocromo c oxidase I, COI

### 3. Banco de Germoplasma

O banco de germoplasma de *B. mori* consiste de raças isoladas, estoques genéticos, raças derivadas de espécies selvagens e de híbridos exóticos. Também inclui raças melhoradas de diferentes origens geográficas, tais como Índia, China, Japão, Rússia, Coreia do Sul e França. Também são conhecidos e mantidos mais de 300 mutantes criados graças ao avanço da tecnologia. Estas mutações são relacionadas a características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e de comportamento.

O progresso da sericultura depende da variabilidade genética contida nas raças mantidas nos bancos de germoplasma, pois muitas raças foram e serão usadas para a formação de híbridos comerciais que unem as características desejadas. Dependendo do alvo fenotípico do experimento, raças do bicho-da-seda podem ser selecionadas a partir do banco de germoplasma, que deve ser capaz de fornecer os materiais de reprodução desejados para os criadores. A coleta, caracterização, avaliação, conservação e manutenção sistemática dos estoques do bicho-da-seda sem perder suas características qualitativas e quantitativas originais são de extrema

importância. Esta preservação é importante também para que cruzamentos e retrocruzamentos com espécies selvagens que possam ser exploradas visando transferir alguns bons caracteres para *Bombyx mori*, tais como adaptabilidades para variadas condições climáticas, hábito alimentar, alta resistência para doenças, incremento na qualidade do fio da seda

Mais de 320 características hereditárias de *B. mori* têm sido relacionadas para avaliação e caracterização das raças de bicho-da-seda, e existem diferentes raças de bicho-da-seda que podem ser classificadas de diversas maneiras, como, por exemplo, de acordo com a sua origem geográfica, voltinismo, número de ecdises ou até mesmo cor do casulo. No entanto, algumas características são muito semelhantes entre si e a avaliação morfológica pode ser muito morosa e ainda assim não ser discriminatória. Neste sentido, marcadores genéticos e bioquímicos são extremamente úteis nessa classificação.

Identificar e catalogar espécies e raças são fatores de suma importância para auxiliar na preservação das mesmas. Porém identificar e monitorar a biodiversidade de uma região de forma mais eficiente e compreensível ainda é um grande desafio para a ciência e a idéia de um sistema de identificação molecular padronizada começou com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

### **Metodologia experimental**

1. Extração de DNA de mariposas de bicho-da-seda
2. Amplificação da região *barcodes* do gene mitocondrial COI, por meio de PCR
3. Eletroforese em gel de agarose
4. Avaliação dos resultados do gel

#### **1. Extração de DNA de mariposas (*Bombyx mori*)**

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

10. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
11. Transferir o sobrenadante para novo tubo e adicionar 350 µL de **fenol** e 350µL de **clorofórmio** (1 fenol:1 clorofórmio);
12. Centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
13. Transferir o sobrenadante para novo tubo (1,5 mL) para precipitação;
14. Para precipitar: usar NaCl 5 M ( [final] = 0,2 M) e **etanol** 100% (2x volume) ou **isopropanol** (0,7x volume).  
*Obs: Nesta fase, se tiver pouco sobrenadante, usar etanol no dobro do volume. Se tiver mais que 500 µL de sobrenadante, usar isopropanol*
15. Fechar os tubos presos em um barbante e mergulhá-los em nitrogênio líquido durante 30 segundos;
16. Centrifugar por 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C;
17. Descartar o sobrenadante;
18. Lavar o pellet com **etanol** 70% ou 80% (≈ 70 a 100 µL);
19. Colocar os tubos para secar;
20. Ressuspender o pellet em TE 1X + RNase;

#### **Purificação do DNA**

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

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

### A. Tampão de extração

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

### B. Tampão para proteinase K

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

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

### Material:

- Oligonucleotídeos (*primers*) específicos (5 mM)
- DNA-molde (DNA de *Bombyx mori*) contendo o alvo
- dNTPs (desoxirribonucleotídeos): dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 mM)
- Tampão para *Taq* DNA-polimerase (10X)
- *Taq* DNA-polimerase (1 U/µl)
- MgCl<sub>2</sub> (50 mM)

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

**LepF1:** 5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3'

**LepR1:** 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3'

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

Estimativa da  $T_m$  de iniciadores

A seguinte fórmula pode ser utilizada para estimar a temperatura média de fusão ( $T_m$ ) de um iniciador:  $T_m$  (°C) = 4 x (G + C) + 2 x (A + T)

**Procedimentos:**

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

Quantidades para uma reação:

Água miliQ	8,25 µL
Tampão (10X)*	1,5 µL
dNTPs (1 mM)	0,5 µL
Primer <b>LepF1</b> (5 mM)	0,5 µL
Primer <b>LepR1</b> (5 mM)	0,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 µL
Taq DNA-polimerase (1 U/µl)	1,5 µL
<u>DNA molde (60 ng/µl)</u>	<u>1,5 µL</u>
Volume final	15 µL

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

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

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

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

3. Preparar 5 µL do produto da reação de PCR para eletroforese em gel de agarose.

4. Submeter as amostra a eletroforese em gel de agarose 1,5% .

## 5. Eletroforese em gel de agarose

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

### **Materiais:**

- *TBE 5X (Composição para 1 litro)*

54 g de tris-HCl

27,5 g de ácido bórico

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

- *Gel de agarose 1,5%, 100 mL*

100 mL de TBE 1X

1,5 g agarose

- *Brometo de etídeo (1 mg/ml)*

Usar 1µL para cada 10 mL de gel.

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

- *Transiluminador ultravioleta e máscaras de proteção*

### **Procedimentos**

- Preparação do gel:

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

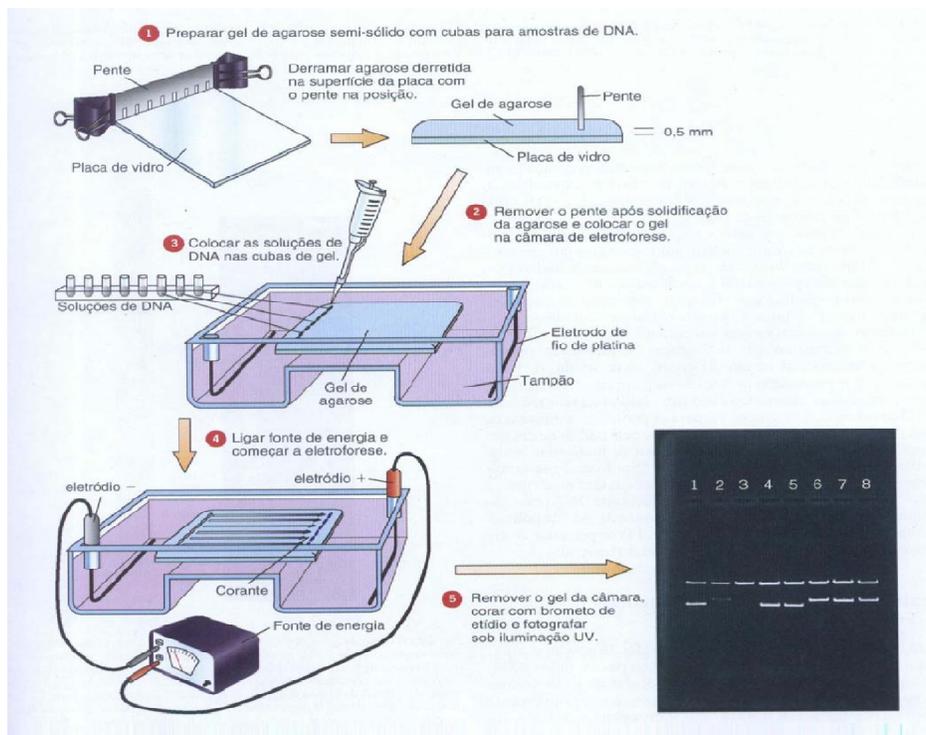
Após a solubilização, a solução de agarose deve ser resfriada por alguns minutos e a ela devem ser adicionados solução de brometo de etídeo (1 mg/ml). Depois disso, agitar a solução e vertê-la sobre uma placa-molde de gel com o pente já montado. Aguardar a polimerização a temperatura ambiente.

- Preparação das amostras:

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

• Eletroforese:

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



## Leituras sugeridas

FERNANDEZ, M.A.; CIFERRI, R.R.; PATUSSI, E.V.; PEREIRA, M.P.; FELIPES, J.; BRAVO, J.P.; ZANATTA, D.B.; GOUVEIA, F.S.; BALANI, V.A. (2005). A Utilização da Biotecnologia na Sericultura Brasileira. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 35:56-61.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. (1995) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. BRASÍLIA: EMBRAPA-CENARGEN, 220P.

HEBERT P.D.N., PENTON E.H., BURNS J.M., JANZEN D.H., HALLWACHS W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(41):14812-7.

KIMURA, M.A. (1980). Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.

KUMAR, S.; GADAGKAR, S.R.(2000). Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *Journal of Molecular Evolution*, 51: 544-553.

KURIN, R. (2002) The Silk Road: Connecting Cultures, Creating Trust. *Talk Story*. Fall. Smithsonian Center for Folklife and Cultural Heritage, 21:1–11.

MITA, K.; KASAHARA, M.; SASAKI, S.; NAGAYASU, Y.; YAMADA, T.; KANAMORI, H.; NAMIKI, N.; KITAGAWA, M.; YAMASHITA, H.; YASUKOCHI, Y.; ODUKA, K.K.; YAMAMOTO, K.; AJIMURA, M.; RAVIKUMAR, G.; SHIMOMURA, M.; NAGAMURA, Y.; SHIN-I, T.; ABE, H.; SHIMADA, T.; MORISHITA, S.; SASAKI, T.(2004) The Genome Sequence of Silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research*, 11:27-35.

MUNHOZ, R.E.F. (2010). Variabilidade genética em raças e híbridos simples de *Bombyx mori* L. do banco de germoplasma da Universidade Estadual de Maringá. Maringá: Universidade Estadual de Maringá. 32p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento).

PORTO, A.J.; OKAMOTO, F.; CUNHA, E.A.; OTSUK, I.P (2004). Caracterização de oito raças de bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.). *Ciência Rural*, Santa Maria, 34(1):259-264.

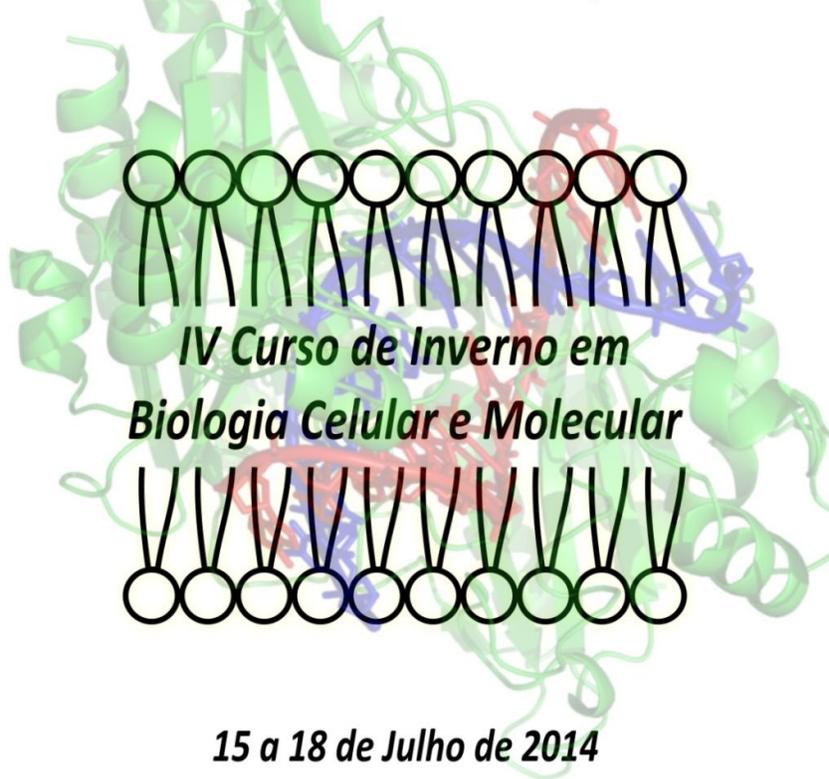
# MINICURSO 2

## IDENTIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE DA PROTEÍNA KIN17



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*

*15 a 18 de Julho de 2014*

**LABORATÓRIO DE ORGANIZAÇÃO FUNCIONAL DO  
NÚCLEO**

**Professores:**

Maria Aparecida Fernandez

**Pós-graduandos:**

Quirino Alves de Lima Neto  
Douglas Vinícius Bassalobre de Freitas  
Fabiana dos Santos Rando  
Anelise Cardoso Ramos  
Vanessa Pinatto Gaspar  
Kátya Jaqueline Ribeiro Passos  
Francisco Ferreira Júnior  
Sabrina Kelmer

## INTRODUÇÃO

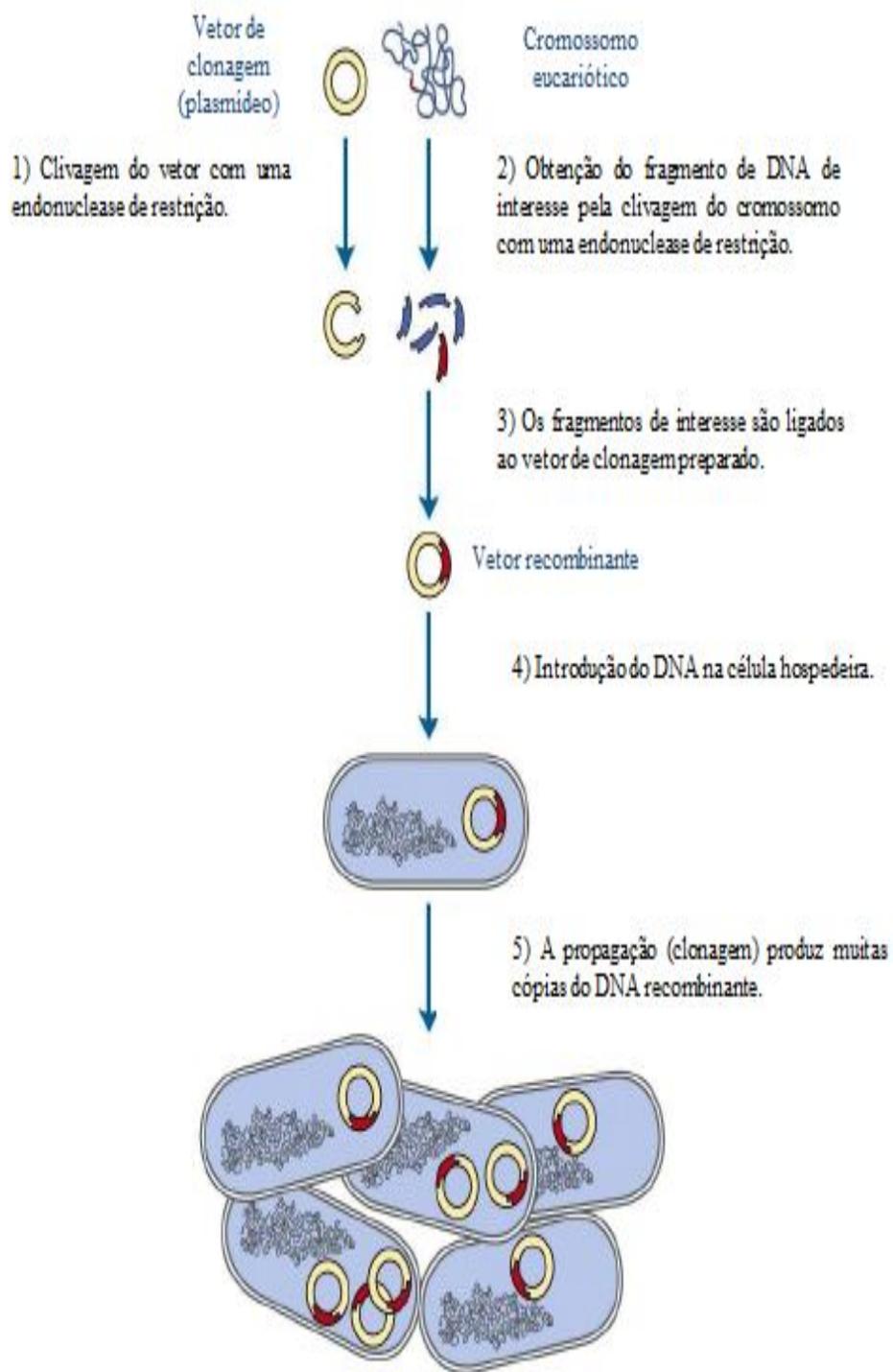
### Princípios Básicos da Clonagem Molecular:

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).

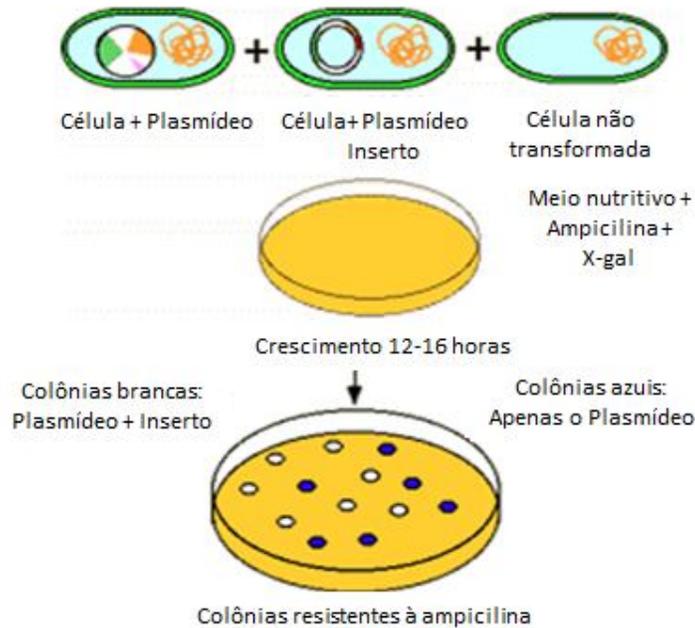
A clonagem de DNA envolve a separação de um gene específico ou segmento de DNA de um cromossomo maior, o qual é ligado a uma molécula de DNA pequena que atua como portadora e introduzido em uma célula hospedeira. O DNA modificado é replicado milhões de vezes por um aumento do número das células hospedeiras. 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.
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  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -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  $\beta$ -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).



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

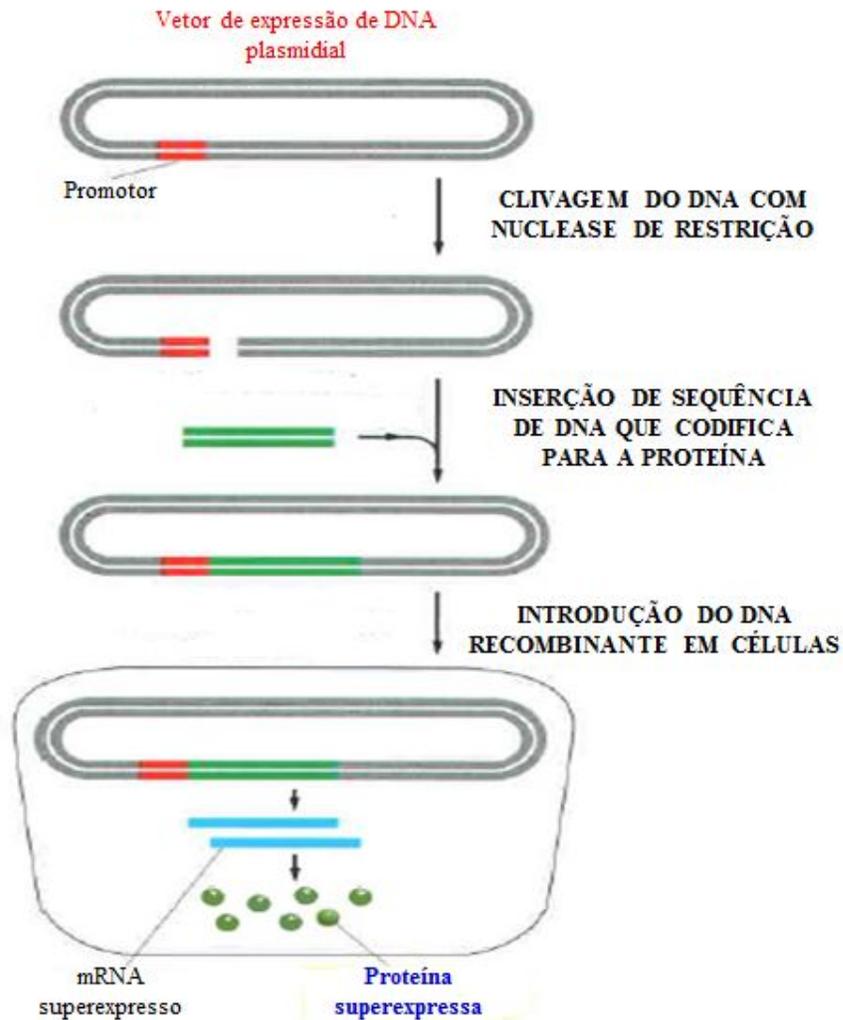


**Figura 2.** Esquema para a seleção de plasmídeos recombinantes em *Escherichia coli* (descrição no texto).

### Expressão Heteróloga de Proteínas:

A maior parte das milhares de proteínas que compõem uma célula é produzida em pequenas quantidades. No passado, para a maior parte delas, foi extremamente difícil obter poucos microgramas de material puro. Uma das contribuições mais importantes da tecnologia do DNA recombinante foi possibilitar a produção da maior parte das proteínas celulares em quantidades quase ilimitadas (Alberts et al., 2010).

Grandes quantidades de uma proteína desejada podem ser produzidas em um organismo hospedeiro (expressão heteróloga) a partir de vetores de expressão, os quais em geral são plasmídeos projetados para produzir um RNA mensageiro (mRNA) que pode ser traduzido em proteína de forma bastante eficiente em bactérias, leveduras, ou em células em cultura de insetos e mamíferos (Figura 3). Para prevenir que a grande quantidade da proteína estranha interfira com o crescimento da célula hospedeira, o vetor de expressão muitas vezes é projetado para inibir a síntese da proteína estranha até pouco antes das células serem coletadas e rompidas (Alberts et al., 2012).



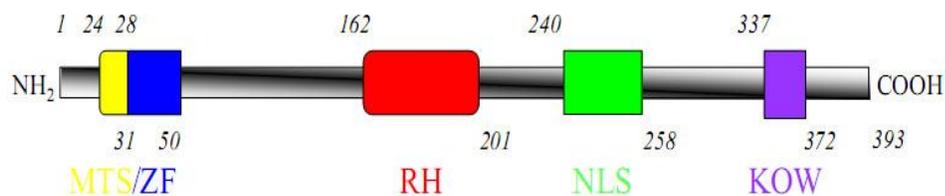
**Figura 3.** Expressão heteróloga de proteínas. Um vetor plasmidial é modificado para conter um promotor altamente ativo, permitindo a produção de grandes quantidades de mRNA de um gene adjacente inserido no vetor plasmidial. Adaptado de Alberts et

Como a proteína de interesse é produzida a partir de um vetor de expressão dentro de uma célula, ela deve ser purificada das proteínas da célula hospedeira por cromatografia. Contudo, como existe grande quantidade da proteína heteróloga no lisado de células (frequentemente 1 a 10% da proteína total), a purificação geralmente é fácil de ser realizada. Vários vetores de expressão foram projetados para adicionar um marcador molecular – um grupo de resíduos de histidina ou uma pequena proteína marcadora – à proteína expressa, de modo a permitir uma fácil purificação por cromatografia de afinidade. Uma variedade de vetores está disponível, cada um modificado para funcionar em um tipo de célula na qual a proteína deverá ser produzida, permitindo a produção de vastas quantidades de proteínas de interesse na

medicina, como a insulina humana, o hormônio de crescimento e os antígenos virais para vacinas (Alberts et al., 2010).

### O Papel da Proteína kin17 no Metabolismo do DNA:

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 1) e um motivo dedo de zinco de ligação ao DNA (**ZF**, Figura 1), 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 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 antisenso 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  $\alpha$ . 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 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).

## CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES

	<b>Terça-feira (15/07)</b>	<b>Quarta- feira (16/07)</b>	<b>Quinta- feira (17/07)</b>	<b>Sexta-feira (18/07)</b>
<b>Manhã</b>	Entrega dos Materiais	Extração de RNA Total	Reação de PCR com o cDNA como molde	
	Palestra de abertura			
<b>Tarde</b>	Introdução teórica ao assunto	Síntese do cDNA	Análise do PCR através de gel de agarose	

## ROTEIRO DAS ATIVIDADES PRÁTICAS

### 1. Extração de RNA Total das células GMA32

As células utilizadas nos experimentos de clonagem do gene da proteína kin17 serão da linhagem GMA32, que são fibroblastos de pulmão de hamster Chinês cultivados em meio mínimo essencial – MEM. Essas células foram gentilmente cedidas pela Dra. Michelle Debatisse (Institut Curie, Paris, França).

#### **Protocolo para Extração de RNA Total através do TRizol (Invitrogen):**

- Dentro da capela de fluxo laminar retirar o meio velho e descartar;
- Adicionar 2mL de PBS 1x e agitar para lavar as células que estão aderidas ao fundo da placa;

- Descartar o PBS 1x;
- Adicionar 2mL de PBS 1x e soltar as células utilizando o rodo de células.
- Transferir as células para um tubo tipo falcon de 15mL;
- Centrifugar 2 min a 2000 rpm;
- Descartar o sobrenadante e deixar o tubo de cabeça para baixo secando no papel toalha;
- Ressuspender o pellet de células com PBS 1x de forma a ficar com um volume final de 250uL.
- Adicionar 750uL de TRIzol e pipetar para cima e para baixo diversas vezes até a completa homogeneização da amostra;
- Incubar a temperatura ambiente por 5 min para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas.
- Adicionar 200uL de clorofórmio;
- Agitar vigorosamente com as mãos por 15 segundos;
- Incubar de 2 a 3 min a temperatura ambiente;
- Centrifugar a amostra a 12.000 x g por 15 min a 4°C;
- Remova a fase aquosa superior pipetando o líquido com o tubo inclinado 45°, evite pipetar qualquer resíduo da interfase ou da fase fenólica;
- Adicionar 500uL de isopropanol 100% para a fase aquosa;
- Agitar e incubar 10 min a temperatura ambiente;
- Centrifugar a amostra a 12.000 x g por 15 min a 4°C;
- Remova o sobrenadante do tubo deixando apenas o pellet;
- Lavar o pellet com 1ml de etanol 70%;
- Centrifugar o tubo a 7500 x g por 5 min a 4°C;
- Retirar o sobrenadante e deixar o pellet secar de 5 a 10 min;
- Ressuspender o pellet em 50uL de água destilada tratada com DEPC.

Dosar o RNA utilizando o equipamento NanoDrop 2000. Em seguida preparar um gel de agarose 1% para verificação da integridade do RNA total extraído.

### Protocolo de 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  
0,3 g agarose

- Brometo de etídeo (1 mg/ml)  
Usar 1  $\mu$ 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  $\mu$ l de cada amostra de RNA total mais 1  $\mu$ 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).

## **2. Síntese da Primeira Fita do cDNA**

Antes de proceder para o reação da síntese da primeira fita do cDNA utilizando uma transcriptase reversa, é preciso que o RNA total seja tratado com DNase I para que o DNA ainda presente na amostra não interfira na reação da transcriptase.

### **Protocolo de Tratamento do RNA total com DNase I (Invitrogen):**

- No gelo adicionar em um tubo de 0,2mL os seguintes componentes:
  - 3ug de RNA total
  - 1uL de 10x DNase I buffer
  - 1uL de DNase I, 1U/uL
  - H<sub>2</sub>O DEPC q.s.p. 10uL
- Incubar 15 min a temperatura ambiente;
- Inativar a DNase I com a adição de 1uL de EDTA 25mM;
- Aqueça o tubo a 65°C por 10 minutos;

### **Protocolo para Síntese da primeira fita de cDNA utilizando M-MLV RT (Invitrogen):**

A enzima “Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT)” utiliza RNA ou DNA de fita simples, para sintetizar uma fita complementar de DNA na presença de um primer.

- Adicionar em um tubo de 0,2mL os seguintes componentes:
  - 1ng a 5ug de RNA total
  - 1uL de oligo(dT)12-18 (500ug/mL), ou 50-250ng de random primers, ou 2pmol de um primer gene específico
  - 4uL de dNTP mix 2,5mM de cada dNTP
  - H<sub>2</sub>O estéril e destilada q.s.p. 13uL
- Aquece o tubo a 65°C por 5 minutos e resfrie rapidamente no gelo;
- Colete o conteúdo do tubo através de um rápido spin;
- Adicione:
  - 4uL 5x First-Strand Buffer

- 2uL de DTT 0,1M

- Homogeneizar a amostra gentilmente e incubar a 37°C por 2 minutos;
- Adicionar 1uL (200 unidades) de M-MLV RT e misturar com a pipeta para cima e para baixo até a completa homogeneização;
- Incubar a 37°C por 50 minutos;
- Inativar a reação aquecendo o tubo a 70°C por 15 minutos.

Agora o cDNA pode ser usado como molde para a amplificação do gene da proteína kin17 por PCR.

### 3. Amplificação do Gene *kin17* através de PCR

O protocolo abaixo serve como um guia geral para reações de PCR que utilizam a Taq DNA polimerase como enzima na amplificação do DNA. No entanto, condições ótimas de reação, tais como, tempo e temperaturas de incubação, concentração de Taq DNA polimerase, primers, MgCl<sub>2</sub> e quantidade de amostra, variam bastante e devem ser otimizadas.

Componente	Volume	Concentração Final
10x PCR buffer sem Mg <sup>+2</sup>	10uL	1x
10mM dNTP mix	2uL	0,2mM cada dNTP
50mM MgCl <sub>2</sub>	3uL	1,5mM
Primer mix (10uM cada)	5uL	0,5uM cada
Amostra de DNA	1 - 20uL	
Taq DNA Polimerase (5U/uL)	0,2 – 0,5uL	1,0 – 2,5 unidades
H <sub>2</sub> O estéril e destilada	q.s.p. 100uL	

#### Protocolo para Amplificação do Gene *kin17* através de PCR utilizando a Taq DNA polimerase (Invitrogen):

- Adicionar em um tubo de 0,2mL os seguintes componentes:
  - 13,5uL de H<sub>2</sub>O estéril e destilada
  - 2uL de 10x PCR buffer

- 0,75uL de MgCl<sub>2</sub>50mM
- 0,5uL de dNTP mix 10mM
- 0,5uL de primer forward kin17 F1
- 0,5uL de primer reverse kin17 R0
- 0,25uL de Taq DNA polimerase
- 2uL 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
  - 25 ciclos {
    - 94°C/ 1 min - Desnaturação
    - 62°C/ 1 min - Temperatura paraanelamento dos primers
    - 72°C/ 1 min - Extensão do DNA
  - 72°C/ 10 min - Extensão final
  - 4° C/ Indefinidamente – Armazenamento
- Retirar a amostra do termociclador e armazenar na geladeira a 4° C.

#### 4. Análise do PCR através de gel agarose

Por fim, preparar um gel de agarose 1%, para verificação do produto de PCR obtido, como descrito anteriormente em Protocolo de Eletroforese em Gel de Agarose.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 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.
- 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.
- [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)
- [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mmlv\\_rt\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mmlv_rt_man.pdf)
- <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/18068015.pdf>
- 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.; GONDRIY, 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.

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.

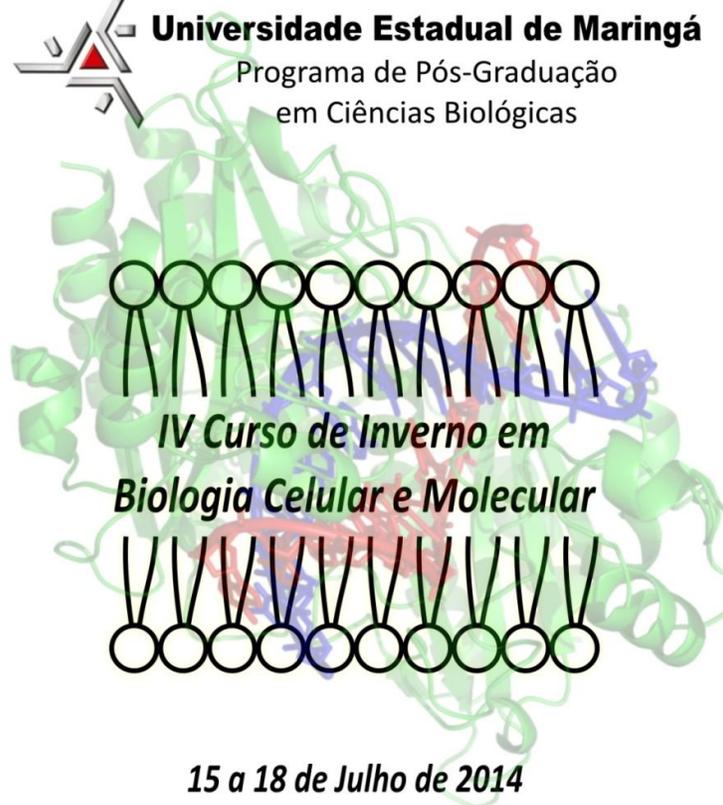
# MINICURSO 3

## PRODUÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*

*15 a 18 de Julho de 2014*

### LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA DE MICROORGANISMOS

**Professores:**

Rosane Marina Peralta

Cristina Giatti Marques de Souza

**Pós-graduandos:**

Aline Cristine da Silva de Souza

Bruna Polacchine da Silva

Caroline AP. Vaz De Araujo

Rafael Castoldi

## 1. INTRODUÇÃO

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

Diversas estratégias para a conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis têm sido demonstradas em escala laboratorial e piloto. O conceito geral envolve pré-tratar a matéria bruta para, então, submetê-la à hidrólise enzimática. Pré-tratamentos físico-químicos tais como tratamentos ácidos e alcalinos e a explosão a vapor são bastante conhecidos para melhorar a conversão da biomassa celulósica em açúcares monoméricos. Entretanto, estes tratamentos requerem grande quantidade de energia e frequentemente geram produtos tóxicos, tornando-os inviáveis economicamente e ambientalmente indesejáveis. Pré-tratamentos brandos e ambientalmente adequados com baixa ou nenhuma produção de poluentes são desejáveis e têm sido objeto de vários estudos. Dentro deste conceito, encaixam-se os pré-tratamentos biológicos dos materiais lignocelulósicos. Tais tratamentos exploram a habilidade de certos microrganismos em degradar a parede celular das plantas (CANILHA et al., 2009; AGUIAR& FERRAZ, 2011).

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

de sacarificação enzimática da celulose e hemicelulose (CONCEIÇÃO et al., 2005).

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

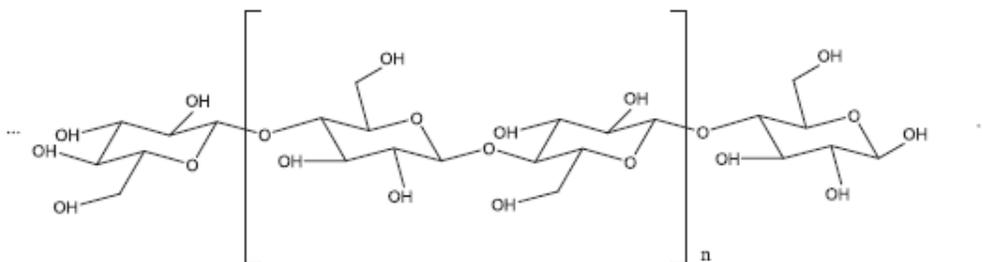
Dentro deste contexto, o bioetanol ou etanol de segunda geração (produzido a partir da biomassa lignocelulósica) vem sendo mundialmente considerado uma importante alternativa ao uso da gasolina. O potencial da transformação de componentes da biomassa em açúcares baseia-se na hidrólise enzimática completa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

### **1.1. Estrutura e composição da biomassa lignocelulósica**

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

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

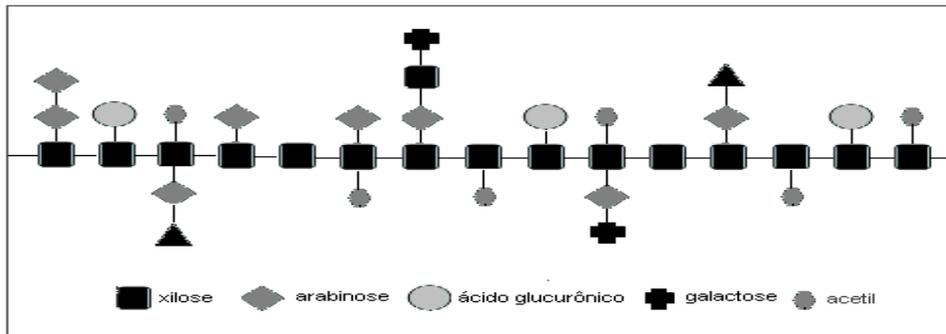
A celulose é o componente mais abundante nos materiais lignocelulósicos e corresponde cerca de 50% da massa seca total. Trata-se de um polímero linear, possuindo porções amorfas e cristalinas, formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose unidas por ligações  $\beta$ -(1,4)-glicosídicas (FENGEL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



**Figura 1:** Estrutura da fração celulósica (CASTRO & PEREIRA, 2010).

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

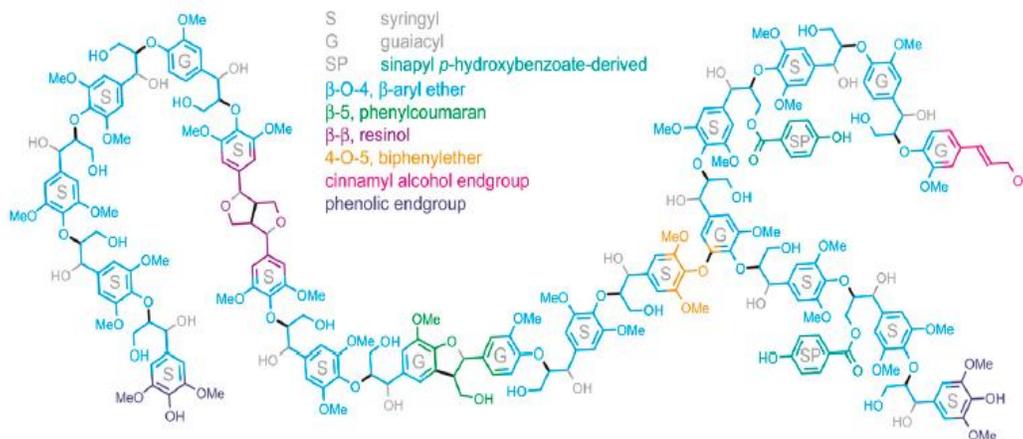
estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando flexibilidade e estabilidade ao agregado (RAMOS, 2003).



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

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

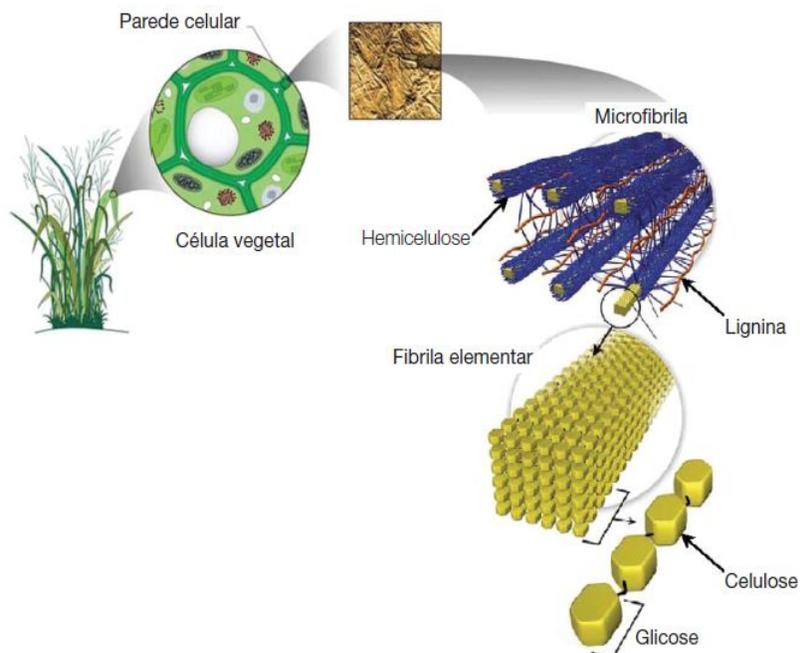
A lignina difere significativamente dos polissacarídeos, pois é, de fato, uma macromolécula aromática formada a partir do acoplamento radicalar de alcoóis hidroxi-cinâmílicos (Fig. 3). Em massa, esse componente representa cerca de 20-30% do material lignocelulósico seco (RALPH et al., 2004).



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

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

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



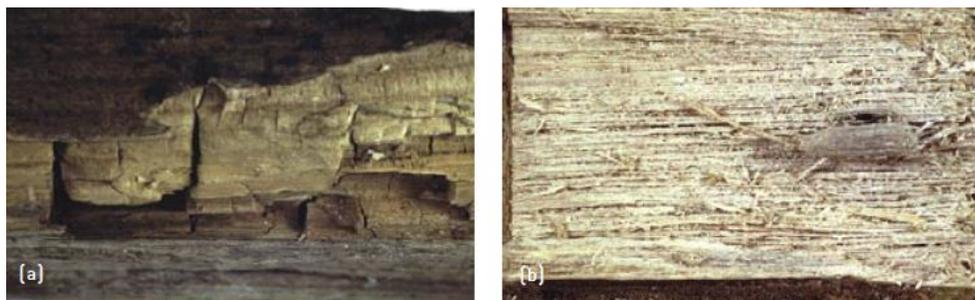
**Figura 4** Arquitetura da parede celular vegetal.

A parede celular em questão apresenta baixa porosidade, o que impede a infiltração de moléculas de elevada massa molar, como as proteínas. Justamente a ultraestrutura coesa e a parede celular não porosa correspondem à grande barreira ao processo biodegradativo. Dessa forma, o grupo de organismos aptos a degradar os materiais lignocelulósicos é bastante restrito.

Estes organismos desenvolveram sistemas metabólicos complexos que permitem desestruturar a parede celular e despolimerizar seus componentes, gerando substâncias susceptíveis ao metabolismo intracelular dos mesmos (FENGEL & WEGENER, 1989; AKTHAR et al., 1998).

## 1.2. Fungos da podridão branca da madeira e enzimas extracelulares

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



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

Os fungos secretam grande diversidade de enzimas no ambiente que são utilizadas para auxiliar na suanutrição, desta maneira são responsáveis pela deterioração de vários materiais naturais, refinados ou processados. Nas últimas décadas, a utilização dos fungos filamentosos e seus metabólitos

nos processos de biorremediação vêm crescendo em virtude do alto potencial degradativo, biossorbitivo (metais pesados e corantes) e dos mecanismos de resistência em condições ambientais adversas (CONCEIÇÃO et al., 2005).

Entre os sistemas degradativos estão relativamente bem descritas algumas enzimas que podem atuar sobre os componentes de forma isolada. Como exemplo, podem ser mencionadas as celulases, que são divididas em endo-1,4- $\beta$ -glicanases (hidrolisam ligações glicosídicas ao acaso, gerando oligômeros) e celobio-hidrolases (hidrolisam os oligômeros gerados pelas endo-1,4- $\beta$ -glicanases, liberando moléculas de celobiose). Um grupo finalizador da hidrólise é composto pelas 1,4- $\beta$ -glicosidases, que hidrolisam a celobiose a glicose. Ainda dentro do complexo celulolítico há a celobiose-desidrogenase que oxida vários açúcares como celobiose, lactose, oligômeros de glicose e, inclusive, a celulose (AGUIAR & FERRAZ, 2011).

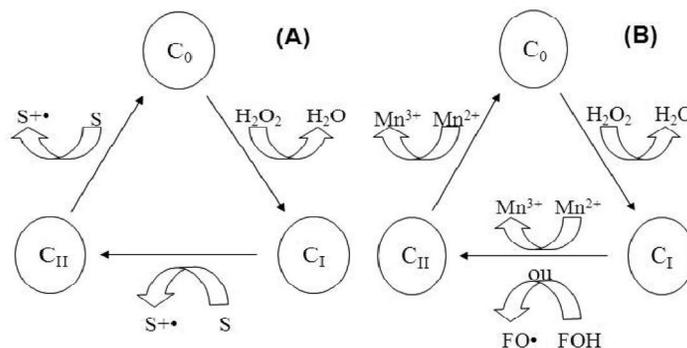
A biodegradação de polioses envolve a ação de enzimas frequentemente classificadas de acordo com os distintos substratos. O sistema hemicelulolítico requerido para a hidrólise da hemicelulose é mais complexo que o sistema celulolítico, já que a hemicelulose apresenta natureza heterogênea. As xilanases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

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

subgrupo contém enzimas que são cuproproteínas e independentes de peróxido para atuarem, as lacases (FREITAS, 2008).

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

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

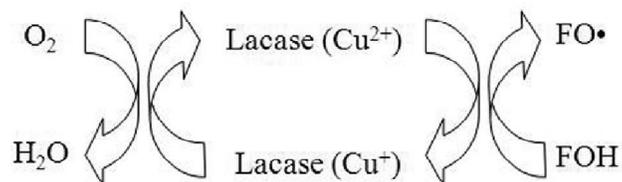


**Figura 6.** Ciclo catalítico simplificado da LiP (A) e MnP (B); S = substrato aromático, FOH = substrato fenólico (AGUIAR& FERRAZ, 2011).

Nos dois casos, a enzima é ativada pela oxidação por  $H_2O_2$ , levando à formação do composto I ( $C_I$ ) que é um oxocomplexo deficiente em 2 elétrons. A redução do  $C_I$  até a enzima nativa ocorre por meio de duas etapas, com a abstração de 1 elétron de cada vez. No caso das LiPs, a redução de  $C_I$  a  $C_{II}$  e também de  $C_{II}$  a  $C_0$  pode ocorrer por meio da oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos levando à formação de radicais cátion (Fig. 6A). Por outro lado, as MnPs dependem de  $Mn^{2+}$  para a redução de  $C_{II}$  a  $C_0$  (Fig. 6B). O composto

I pode ser reduzido ao composto II à custa da oxidação direta de uma estrutura fenólica ou de um átomo de  $Mn^{2+}$ , mas o íon  $Mn^{2+}$  parece o elo preferencial de transferência de elétrons. O  $Mn^{3+}$  formado é bastante reativo, podendo atuar como um mediador da MnP e é normalmente estabilizado por quelantes produzidos pelo próprio fungo, como o ácido oxálico. O complexo  $Mn^{3+}$ -oxalato, por sua vez, pode ser reduzido à custa da oxidação de outra estrutura fenólica (AGUIAR& FERRAZ, 2011).

As lacases atuam pela abstração de um elétron de fenóis, em função da redução de  $Cu^{2+}$  a  $Cu^{1+}$  que, por sua vez, reduz  $O_2$  a  $H_2O$ , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Fig. 7). A estequiometria do ciclo envolve 4  $Cu^{2+}$  (normalmente ligados a uma única proteína ou a 2 cadeias proteicas acopladas), 4 substratos fenólicos, 4 prótons e 1 molécula de  $O_2$ . Entretanto, estas enzimas também podem degradar estruturas aromáticas não fenólicas por meio da oxidação de alguns mediadores sintéticos como o hidroxibenzotriazol (HBT) ou mesmo naturais, como derivados do ácido benzoico e íons  $Mn^{2+}$  (BORTOLAZZO, 2011; AGUIAR& FERRAZ, 2011).



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

### 1.3. Biocombustíveis

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

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

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

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

açúcar em etanol. A etapa final consiste em uma destilação fracionada (SILVA, 2010).

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

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

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

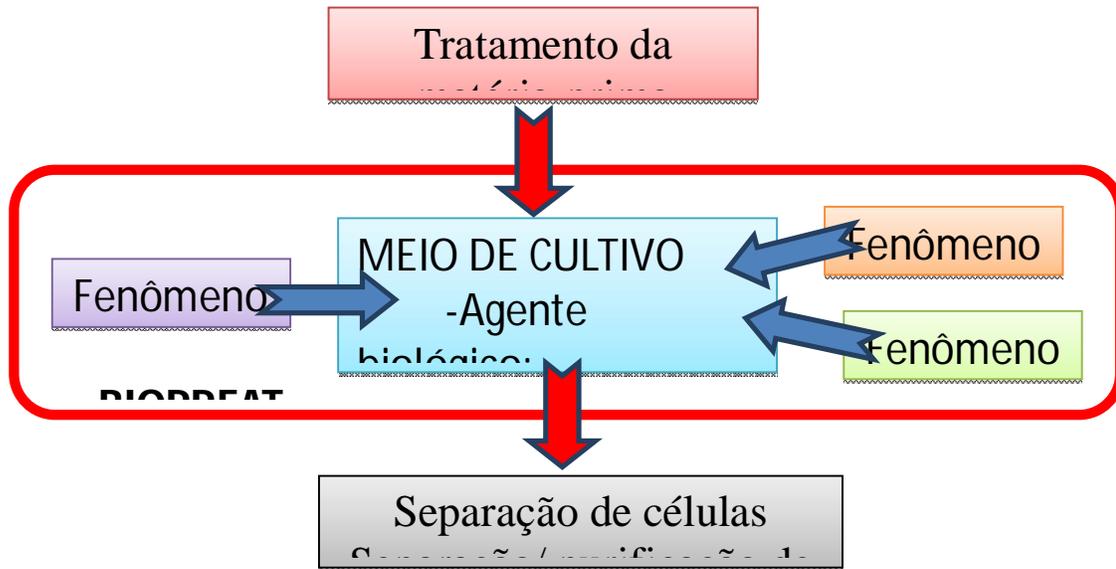
No que diz respeito ao pré-tratamento biológico das fibras lignocelulósicas, um dos possíveis processos para a degradação da lignina e posterior sacarificação é a utilização dos fungos da podridão branca, que, como

já foi mencionado, possuem um arsenal de enzimas com capacidade ligninolítica: lacases e peroxidases. Estas enzimas atuam sobre a lignina degradando-a, facilitando assim a atividade da celulase nas fibras (CONCEIÇÃO et al., 2005). Assim, os açúcares liberados após o pré-tratamento, seguido da sacarificação com celulases, podem ser utilizados para várias finalidades, dentre elas a produção de etanol de segunda geração (CASTRO, 2010).

#### **1.4. Bioprocessos e biorreatores**

Bioprocessos envolvem o cultivo de células vivas (micróbios, mamíferos ou plantas), organelas ou enzimas imobilizadas em biorreatores com o objetivo de produzir materiais bioquímicos de interesse comercial, tais como vacinas, enzimas e antibióticos. Além da produção destes produtos pode-se, utilizar os bioprocessos para a remoção de resíduos industriais, na purificação de água, tratamento de efluentes e gestão de resíduos sólidos. Para ser viável industrialmente os bioprocessos devem possuir vantagens sobre os métodos convencionais tais como os químicos, seja por produzirem materiais finos como vacinas, seja por trabalharem em baixas temperaturas e pHs.

No processo biotecnológico em larga escala precisamos controlar todo o sistema de forma eficiente, assim são realizados dentro de biorreatores ou sistemas de contenção, de forma que todos os parâmetros possam ser controlados e reproduzíveis, utilizando sempre as mesmas quantidades de matérias-primas e de inóculo, produzindo precisamente a mesma quantidade de produto. As etapas para formação do produto no bioprocessos tecnológicos são semelhantes, não importando o organismo meio utilizado ou produto formado, sendo estas divididas em três etapas: a preparativa (*upstream*), a fermentativa e a de recuperação (*downstream*) (fig 8).



**Figura 8.** Esquema de cultivo em biorreator com as etapas anterior (*upstream*) e posterior (*downstream*) a ele.

Biorreatores, reatores bioquímicos, reatores biológicos são os reatores químicos nos quais ocorre uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores, sendo estes enzimas ou células, sejam para produção de cerveja, ácidos orgânicos ou aminoácidos, antibióticos, enzimas, vacinas ou paraborremediação. Basicamente os biorreatores apresentam os seguintes componentes: frasco de cultivo, motor elétrico conectado a um eixo que se estende até o interior do frasco, bomba compressora de ar, sensores de temperatura, pH e oxigênio

O frasco de cultura é desenhado de tal forma a permitir uma ótima aeração do meio de cultura, bem como uma homogeneização satisfatória com um mínimo de dano mecânico do material em cultivo. Os frascos podem ser feitos de vidro, aço inoxidável, policarbonato, polipropileno ou qualquer outro material que suporte a autoclavagem a uma temperatura de 121<sup>o</sup>C durante 15 a 30 minutos. Frequentemente, o frasco de cultivo apresenta um envoltório metálico em fora de jaqueta, por onde circula água com temperatura pré-determinada, para controle da temperatura do cultivo. A homogeneização do meio de cultura e a aeração do material em cultivo são feitos de diversas formas, sendo a mais comum a injeção de um fluxo de ar a uma determinada

pressão, combinada com o movimento de uma hélice no interior do frasco de cultivo. O ar que entra no sistema é esterilizado ao ser forçado a passar através de uma membrana com poros de 0,22 a 0,44 micras de diâmetro. O tamanho do frasco de cultivo normalmente varia entre 1 a 20 litros, sendo os mais utilizados entre 1 a 4 litros.

Os reatores mecanicamente agitados (STR – *stirred tank bioreactor*) ou reatores de mistura (figura 9a) são os mais empregados (90% do total de reatores industriais). Este reator consiste em um tanque cilíndrico, equipado com chicanas (“*baffles*”) e um agitador central ligado a um motor.

Nos reatores agitados pneumaticamente a agitação do líquido é feita por meio do borbulhamento de um gás (normalmente ar) no reator, gerando menor tensão de cisalhamento, o que os torna atraentes para o cultivo de células animais e vegetais. O biorreator “*air-lift*” (ou “*loop reactors*”) difere da coluna de bolhas (“*bubble column*” ou reatores tipo torre) (figura 10A) pela presença de um dispositivo, colocado interna ou externamente, denominado *draft tube* (figura 10B). As funções deste dispositivo incluem: o aumento do grau de mistura, imprimindo, fundamentalmente, escoamento axial, a redução da coalescência das bolhas e a equalização das forças cisalhantes ao longo do biorreator. Tanto o biorreator “*air-lift*” quanto o de coluna de bolha são comumente utilizados em culturas de microrganismos sensíveis ao cisalhamento decorrente da movimentação do líquido.

**Quadro 1: Classificação geral dos biorreatores**

<b>Classificação geral dos biorreatores</b>			
<b>(I) Reatores em fase aquosa (fermentação submersa)</b>			<b>(II) Reatores em fase não aquosa (fermentação semi-sólida)</b>
<p><b>(I.1) Células/ enzimas livres:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Reatores agitados mecanicamente (STR: "<i>stirred tank reactor</i>")</li> <li>- Reatores agitados pneumaticamente</li> <li>- Coluna de bolhas ("<i>bubble column</i>")</li> <li>- Reatores "<i>air-lift</i>"</li> <li>- Reatores de fluxo pistonado ("<i>plug-flow</i>")</li> </ul>	<p><b>(I.2) Células/ enzimas imobilizadas em suportes:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Reatores com leito fixo</li> <li>- Reatores com leito fluidizado</li> <li>- Outras concepções</li> </ul>	<p><b>(I.3) Células/ enzimas confinadas entre membranas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Reatores com membranas planas</li> <li>- Reatores de fibra oca ("<i>hollow-fiber</i>")</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reatores estáticos (reatores com bandejas)</li> <li>- Reatores com agitação (tambor rotativo)</li> <li>- Reatores com leito fixo</li> <li>- Reatores com leito fluidizado gás-sólido</li> </ul>

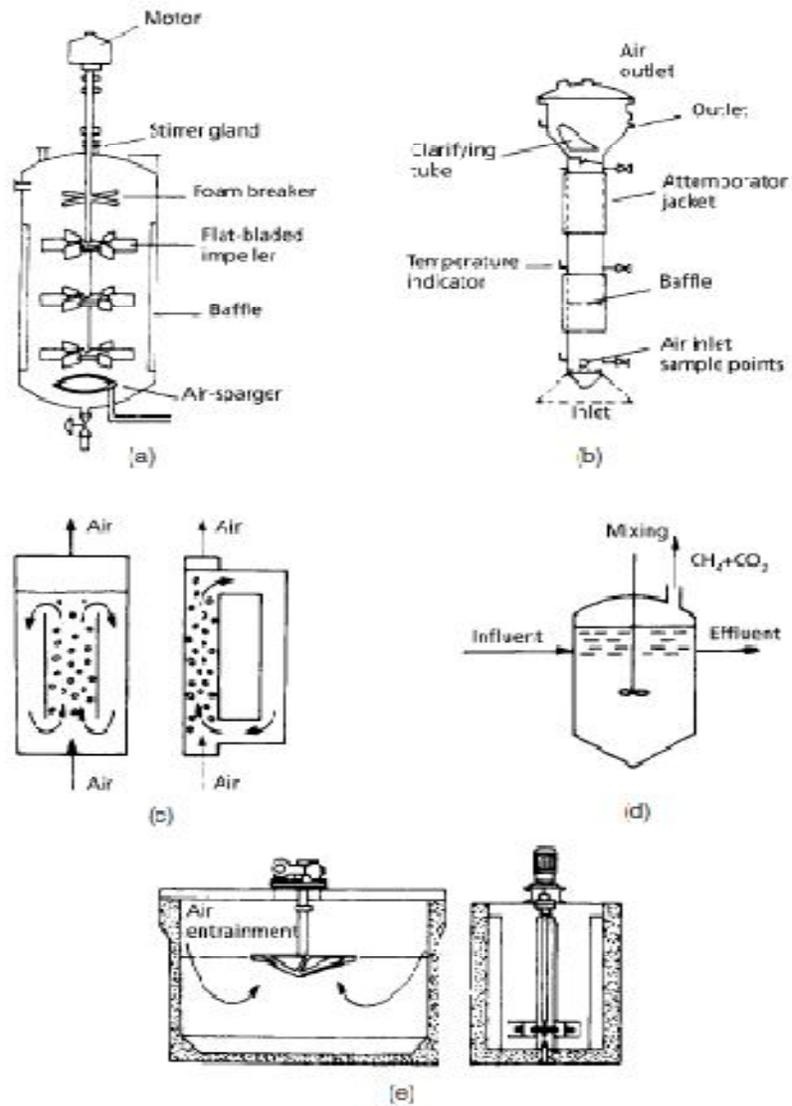


Figura 9. Vários tipos de biorreatores. (a) Biorreator de tanque contínuoagitado (STR). (b) Biorreator de torre. (c) Biorreator em curva (reciclagem). (d) Biorreator de digestoraeróbico (e) Biorreator de lodo ativado. (Fonte: Smith, 2009)

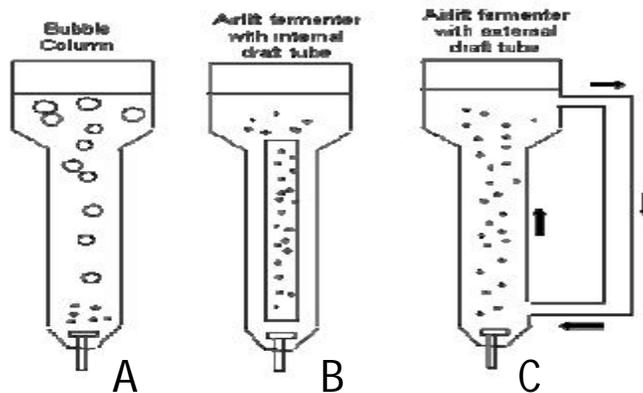
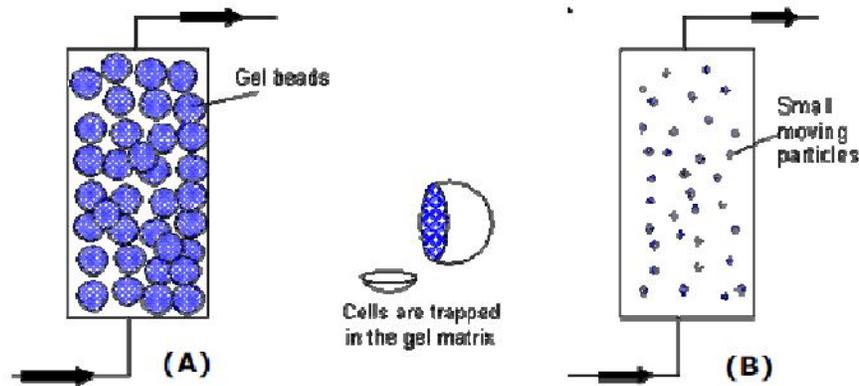


Figura 10. Biorreatores com escoamento pneumático (Fonte: Pereira, 2008).

Dependendo da movimentação relativa das partículas (*“pellets”*), distinguem-se os reatores de leito fixo, onde a movimentação é praticamente inexistente, e os de leito fluidizado, onde há uma movimentação intensa das partículas, sendo que a fluidização do leito pode ser provocada pela injeção de ar, ou de gás inerte, ou ainda por uma corrente de recirculação de líquido no reator.

Os reatores com lâminas de membranas planas e os reatores de fibra oca (*“hollow-fiber”*) mantêm as células confinadas entre membranas semipermeáveis (*“entrapped biocatalyst”*), as quais permitem o fluxo de líquido, mas não a passagem células. Assim, ocorre a separação entre os fluxos de nutrientes e produtos metabólicos, e uma primeira separação do produto desejado. Como ocorre a passagem de nutrientes e produtos através de membranas, esse tipo de reator costuma ser designado por “reator de perfusão”. No entanto, o termo reator ou sistema de perfusão, tem sido empregado de forma mais genérica, incluindo a situação de um reator STR com reciclo externo de células por filtração por membranas, ou ainda, simplesmente designada um reator com células imobilizadas.

Os tipos de biorreatores para células/enzimas imobilizadas mais comumente utilizados são: CSTB, leito fixo (figura 11A) e leito fluidizado (figura 11B), sendo os dois últimos mais indicados por minimizarem a exposição da biopartícula (agentes biológicos imobilizados) a elevados graus de cisalhamento e colisões.



**Figura 11:** Biorreatores com células/enzimas imobilizadas. (A) leito fixo; (B) leito fluidizado (Fonte: Pereira, 2008).

Do ponto de vista dos modos de operação, um biorreator pode ser classificado como batelada, batelada alimentada ou operação contínua. Batelada alimentada: constitui-se na inserção do volume total dos componentes da reação no início da operação, retirando-se o volume total esperado ao final do processo; batelada alimentada ou semi-batelada: partes dos reagentes são inseridas no início do processo, sendo acrescido por partes ou continuamente até alcançar o volume final de reagentes. Ao final do processo, retira-se o volume completo do produto final. Também sob esta definição está a situação para a inserção completa dos reagentes e a retirada gradual do produto final; operação contínua: nesse modo de operação existe o fluxo contínuo de reagentes na entrada e um fluxo contínuo de produtos final na saída.

Os fatores a serem considerados para escolher o tipo de biorreator são: a) modo de operação: descontínuo (mais barato e de multiuso) e contínuo (mais caro e desenhado para um processo específico); b) custo do total do processo; c) estabilidade da célula ou enzima ao longo do processo; d) requisitos operacionais, como a possibilidade de pleno controle do pH e da temperatura, permitir operar em concentrações não inibitórias de substrato, ser adequado frente às características da matéria-prima (por exemplo, o reator contínuo de leito fixo seria inadequado se a matéria-prima a ser processada contiver sólidos insolúveis) e permitir a substituição do catalisador desgastado pelo uso sem interrupção do processo (por exemplo, o

reator continuamente agitado é muito versátil nesta situação). Já os principais problemas operacionais com os biorreatores são: a) efeitos difusionais; b) retormistura; c) gradientes de temperatura e pH no interior do biorreator; d) variação da pressão interna; e) queda do desempenho do biorreator ao longo do tempo.

**Componentes do biorreator:**



**Figura12:** Componentes do biorreator (Fonte: Manual de instruções Tecnal Tec-Bio v. 2.0 Biorreator-Fermentador Modelos: 1,5; 4,5; 7,5; 15,0).

**Painéis de controle do biorreator:**

a. **Diagnóstico:**



Figura 13: Aba de diagnóstico (Fonte: Manual de instruções Tecnal Tec-Bio v. 2.0 Biorreator-Fermentador Modelos: 1,5; 4,5; 7,5; 15,0).

b. Calibração:

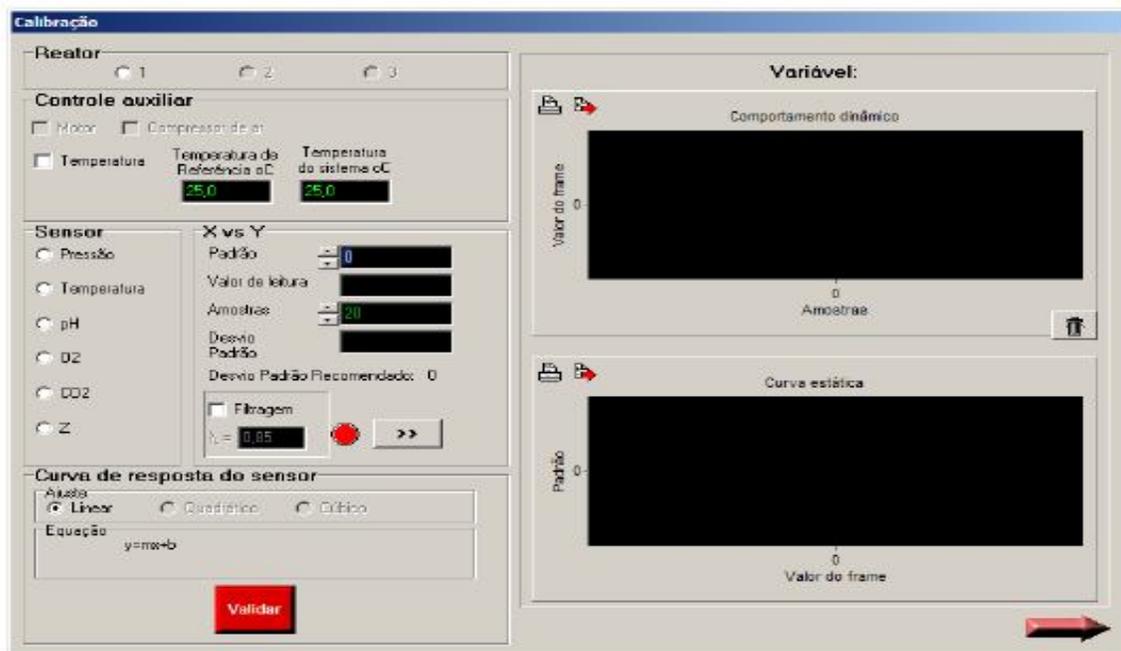
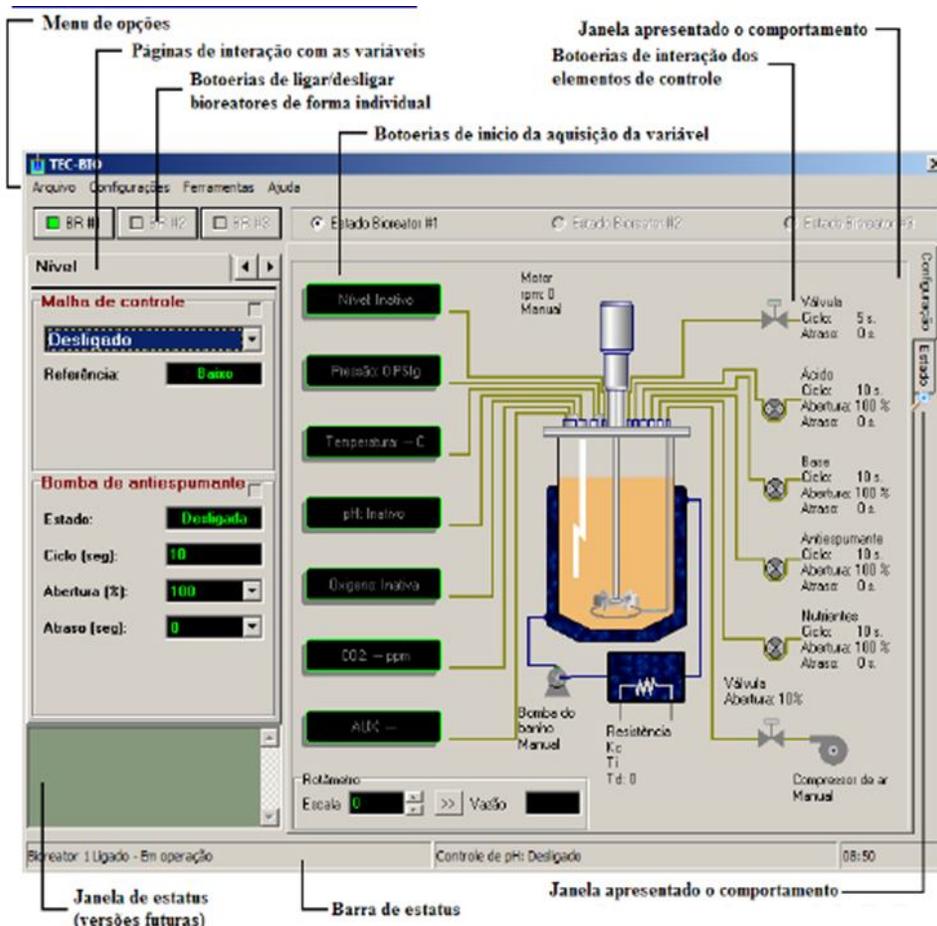


Figura 14: Aba de calibração (Fonte: Manual de instruções Tecnal Tec-Bio v. 2.0 Biorreator-Fermentador Modelos: 1,5; 4,5; 7,5; 15,0)

c. Controle:



**Figura 15:** Aba de controle do processo fermentativo (Fonte: Manual de instruções Tecnal Tec-Bio v. 2.0 Biorreator-Fermentador Modelos: 1,5; 4,5; 7,5; 15,0).

## 2) Execução de calibração de pH e O<sub>2</sub> do biorreator.

Em **controle auxiliar**, liberar a tela no botão ligar e definir os parâmetros:

- a. **Calibrar sensor de pH** (antes de autoclavar):
  - 1) Selecionar o item **sensor de pH**, colocar o eletrodo no pH 4,
  - 2) Espera confirmação (vermelho→verde) e clicar em confirmar,
  - 3) Depois colocar o pH 7, espera confirmação (vermelho→verde) e confirmar.
- b. **Calibrar sensor O<sub>2</sub>**: (após autoclavar)
  - 1) Selecionar o sensor de O<sub>2</sub>,
  - 2) Borbulhar N<sub>2</sub> no vaso e deixar calibrar (vermelho→verde) e confirmar;
  - 3) Borbulhar gás oxigênio atmosférico para ser o 100%, clicando no compressor de ar na caixa de controle auxiliar, deixando calibrar (vermelho→verde) e confirmar.
  - 4) Para facilitar a dispersão dos gases liga-se o motor em no mínimo 200 rpm, clicando na caixa de controle auxiliar.

### 3) Preparo do vaso para esterilização.



**Figura 16:** Vaso preparado para esterilização por autoclavagem (foto laboratório de bioquímica de microrganismos).

As leveduras *S. cerevisiae* apresentam alta eficiência fermentativa, um crescimento rápido, eficiente metabolização de açúcares, habilidade na produção e consumo de etanol, tolerância a altas concentrações de etanol e baixos níveis de oxigênio, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura, e atividade celular em ambientes ácidos que são fundamentais na sua utilização industrial. Além disso, conseguem sobreviver e se adequar a ambientes inóspitos e estressantes

através da sua capacidade de formar filamentos, de apresentar crescimento invasivo sob a forma de pseudohifas, de flocular, de formar espuma e de desenvolver biofilmes. Este micro-organismo não só pode explorar novos ambientes à procura de nutrientes, como também consegue se fixar e persistir naqueles adequados ao seu desenvolvimento.

*Saccharomyces* é um micro-organismo aeróbio facultativo, sendo os produtos finais do metabolismo do açúcar dependentes das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim, em aerobiose, o açúcar é transformado em biomassa, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, e em anaerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO<sub>2</sub> (fermentação alcoólica). Os carboidratos considerados substratos para a fermentação, tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura. O etanol e o CO<sub>2</sub> resultantes se constituem, tão somente, de produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose. A *S. cerevisiae* é tradicionalmente utilizada para a produção de bebidas alcoólicas e etanol, tendo açúcares como sacarose e glicose como substratos. Este micro-organismo também possui a capacidade de produzir etanol a partir de material lignocelulósico.

## 2. OBJETIVOS

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

- Relacionar o efeito do crescimento dos basidiomicetos na biomassa lignocelulósica com a liberação de açúcares fermentáveis.
- produzir etanol a partir dos açúcares fermentáveis em biorreator com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Cultivos de basidiomicetos em diferentes resíduos lignocelulósicos**

Dois isolados de basidiomicetos, *Trametes* sp M3 e *Pleurotus ostreatus*, serão cultivados em três resíduos agroindustriais (farelo de trigo, serragem de eucalipto e bagaço de cana) por meio de fermentação no estado sólido.

Para os cultivos, 4 g de cada resíduo serão adicionados em frascos Erlenmeyers de 125 ml. Os substratos serão suplementados com 1% de glicose e 2% de extrato de levedura nos cultivos com *P. ostreatus*. Os meios serão umedecidos com meio mineral de Vogel (1959) para atingir umidade inicial de 86% para os cultivos com M3 e 70% de umidade com *P. ostreatus*. Cada frasco será inoculado com três discos de agar-batata-dextrose completamente colonizados com micélio. Os cultivos ficarão em estufa a 28°C, no escuro e sem agitação por 15 dias, quando, então, serão interrompidos com a adição de 20 ml de água destilada, homogeneização e agitação por 20 minutos a 8°C. O conteúdo líquido de cada frasco será filtrado, com a utilização de gaze e funil, e o filtrado obtido – extrato enzimático bruto - será centrifugado para posteriores análises enzimáticas. Cultivos abióticos serão realizados para controle.

#### **3.2. Análises enzimáticas**

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

**3.2.1. Lacase:** A atividade da lacase será determinada a 40°C usando o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) como substrato. A mistura de reação conterá 200 µl de ABTS (10 mM), 100 µl do filtrado em 1,7 ml de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 4,0 ou 5,0). O aumento da absorvância será monitorado a 420 nm (PELÁEZ et al., 1995).

**3.2.2. Celulase:** A atividade da celulase será determinada a 40°C utilizando-se o substrato carboximetilcelulose a 1%, pela liberação de açúcares redutores, utilizando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

### **3.3. Tratamentos biológico e enzimático da biomassa lignocelulósica para obtenção de açúcares fermentáveis**

O tratamento biológico sobre a biomassa lignocelulósica com fungo da podridão branca da madeira se desenvolverá com o crescimento de um basidiomiceto nos cultivos citados no item 1 da metodologia.

Após o tratamento da biomassa com o fungo, a mesma será submetida ao tratamento com a enzima celulase comercial, para ocorrer a degradação dos polímeros da celulose do meio em açúcares fermentáveis. Após os 15 dias de cultivo, a biomassa lignocelulósica será homogeneizada e seca a 50°C até peso constante e em seguida triturada (30 mesh). O tratamento enzimático será realizado com 5% da biomassa devidamente seca e triturada em tampão citrato de sódio (pH 5,0), a 37°C, durante 24 horas, com 5 U/ml de celulase (SILVA et al., 2011). Durante o tratamento, serão retiradas alíquotas para análises de açúcares redutores, que serão determinados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

### **3.4. Fermentação em biorreator:**

**3.4.1. Micro-organismo utilizado:** *Saccharomyces cerevisiae*

### 3.4.2. Meio de cultura com melaço

- **Meio de multiplicação:** Caldo de cana 4 °Brix acrescido de 10 mL de solução de sais por litro de meio com pH ajustado para 5,5 – 6,0.
- **Meio de fermentação:** Caldo de cana 16 °Brix, acrescido de 10 mL de solução de sais por litro de meio com pH ajustado a 4,5 ( biorreator).

- **Solução de Sais para 1 litro de solução:**

- 50 g de sulfato de amônio,
- 20 g de fosfato monobásico de potássio,
- 10 g de sulfato de magnésio,
- 1 g de sulfato de zinco
- 1 g de sulfato de manganês

- **Solução Salina:** 0,9 g de NaCl em 100 mL de água destilada.

- **Azul de tripan (vialibidade celular)**

0,3g de azul de tripan em 100 mL de PBS.

- **PBS**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -----1,15g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -----0,20g

NaCl ----- 8,0g

KCl ----- 0,20 g

Para 1,0L de H<sub>2</sub>O destilada, ajusta pH 7,3 com HCl 1N ou NaOH 1N, autoclavar.

### 3.4.3. Procedimentos:

- **Multiplicação das leveduras:**

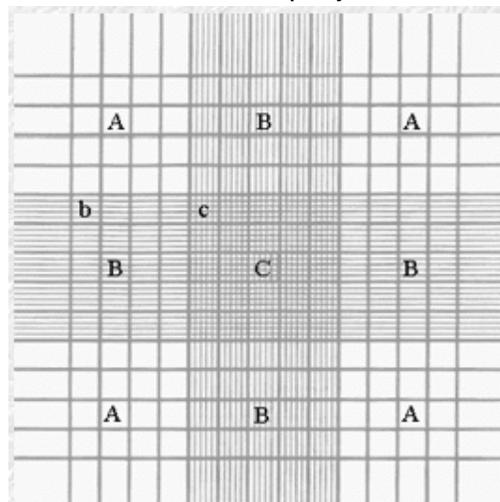
1. Colocar 150 ml de melaço a 4 °Brix + 10 mL por litro de solução de sais (erlenmeyers de 250 mL).
2. Pesar 2gr de levedura e transferir para o frasco.
3. Incubar sobre agitação a 320 RPM, 30 °C por 24 horas.

- **Análise da viabilidade das leveduras: contagem de células em câmara de Neubauer**

Uma das formas mais comuns de se determinar a viabilidade celular é através do uso da câmara de Neubauer, também conhecida como hemacitômetro.



A câmara de Neubauer consiste de uma lâmina de microscopia, bem mais alta do que uma lâmina normal, com marcações em quadrantes, de medidas conhecidas. Observando-se ao microscópio, percebe-se que existem três tipos de quadrantes denominados A, B e C, que juntos formam um quadrado maior.



Pode-se notar que estes quadrantes têm sub-divisões diferentes, fazendo com que o critério para escolha do quadrante onde serão contados as células, seja o tamanho das células a serem quantificadas. Assim, usualmente, células muito pequenas são contadas no quadrante C, as de tamanho intermediário no quadrante B, enquanto células grandes são contadas no quadrante A.

A área total compreendida pelos 9 quadrantes é de  $9 \text{ mm}^2$  sendo que cada quadrante (A, B e C) são quadrados de  $1 \times 1 \text{ mm}$ . Ao ser colocada a lamínula (especial para ser usada na câmara de Neubauer) a distância da lamínula até a lâmina (profundidade) mede  $0,1 \text{ mm}$ , o que permite se obter um volume de  $0,1 \text{ mm}^3$  em cada quadrante.

A câmara é precisamente dividida em quadrados de  $1 \text{ mm}^2$  de área; a lâmina é coberta com uma lamínula, que deixa um volume, sobre cada quadrado, de  $10^{-4} \text{ cm}^3$  ou  $0,1 \text{ mm}^3$ .

$0,1 \text{ mm}^3 - 0,0001 \text{ cm}^3 - 0,0001 \text{ mL}$  ou  $10^{-4} \text{ mL}$ , assim, o fator de correção é  $10^4$

- **Corantes de exclusão:** Azul de Trypan ou eritrosina.

Células viáveis: membrana íntegra → corante não é incorporado → células brancas

Células inviáveis: membrana rompida → corante é incorporado → células azuis ou rosas

### Procedimento

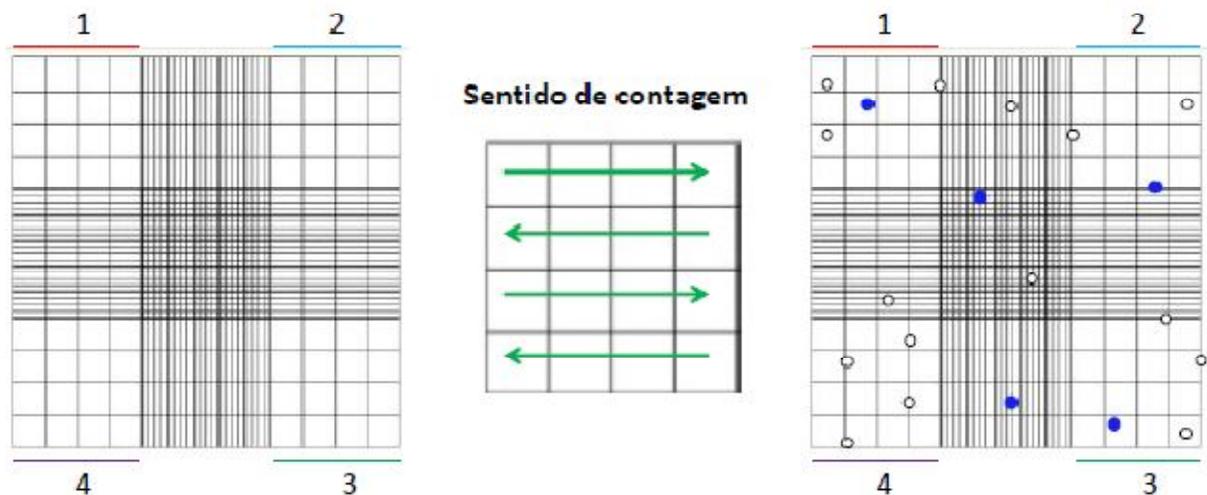
1- Transferir 980  $\mu$ L de meio para um microtubo + 10  $\mu$ L de amostra (células) + 10  $\mu$ L de corante de exclusão (diluição 1/100). Homogeneizar.

2 - Colocar a lamínula na Câmara de Neubauer e com auxílio da micropipeta colocar 10  $\mu$ L da suspensão entre a câmara e a lamínula.

3- Levar ao microscópio óptico e com a objetiva de 40X, fazer a contagem das células nos campos.

4- Marcar o número de células viáveis (células que não se colorem) e células inviáveis (coloridas).

**Regiões de contagem:** 1, 2, 3 e 4



- **Regras de contagem**

1) **Grupos:** contar o número de células no grupo ou considerá-lo como 1 célula

- 2) **Células sobre a linha:** contar somente células sobre as linhas superior e direita.

**Nº de células/mL** = N<sup>0</sup> células contadas / n<sup>0</sup> quadrantes contados X diluição X fator de correção da câmara (10<sup>4</sup>)

**Nº de células/mL** = 10/4 X 10 X 2 X 10<sup>4</sup> = 50 x 10<sup>4</sup> células /mL

Se queremos 1 x 10<sup>4</sup> células em um volume de 100 µL:

50 x 10<sup>4</sup> ----- 1 mL

1 x 10<sup>4</sup> ----- X mL

X = 0,02 mL = 20 µL de meio de cultura contendo as células

Adicionar 80 µL para completar para 100 µL.

% de viabilidade = (células vivas x 100) / (células vivas + células mortas)

- **Fermentação em biorreator:**

1. Centrifugar em tubo cônico de 50 mL os cultivos de multiplicação,
2. Colocar 3g de levedura em 500 mL de meio de fermentação,
3. Programar no biorreator a temperatura (28°C), rotação do motor (115rpm), oxigênio, pH, solução nutriente.
4. Fermentar por 12 a 24 horas a 30°C.
5. Analisar a quantidade de etanol produzido após concentrá-lo em destilador.

- **Concentração do álcool obtido no destilador.**

- 1) Ligar a bomba de vácuo e a refrigeração.

- **Análise do álcool obtido com alcoômetro.**

- 1) Colocar o etanol obtido em proveta para medir o volume.
- 2) Mergulhar o alcoômetro e avaliar a porcentagem de álcool.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

ANEEL. **Boletim Energia**. Energia no Brasil e no Mundo: Consumo, 2008. Disponível em: [http://www.aneel.gov.br/arquivos/PDF/atlas\\_par1\\_cap2.pdf](http://www.aneel.gov.br/arquivos/PDF/atlas_par1_cap2.pdf). Acesso em: 23 de abril de 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood Chemistry: Ultrastructure and Reactions*, 1<sup>o</sup> ed., Walter de Gruyter: Berlin, 1989.

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

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

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

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

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

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

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

Manual de instruções Tecnal Tec-Bio v. 2.0 Biorreator-Fermentador Modelos: 1,5; 4,5; 7,5; 15,0.

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

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

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

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

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

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

Pereira, Jr., Nei Tecnologia de bioprocessos / Nei Pereira Jr., Elba Pinto da Silva Bom, Maria Antonieta Ferrara. Rio de Janeiro: Escola de Química/ UFRJ, 2008. 62p. (Séries em Biotecnologia, v. 1).

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

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

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

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

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

Smith E. J.; *Biotecnologia 5ª edição*, Cambridge University Press, Editora , 2009 Capítulo 4, Tecnologia de bioprocessos e fermentações, p. 280.

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

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

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

Teixeira, J.B. Biorreatores. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 24, janeiro/ fevereiro, p. 36-41, 2002.

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

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

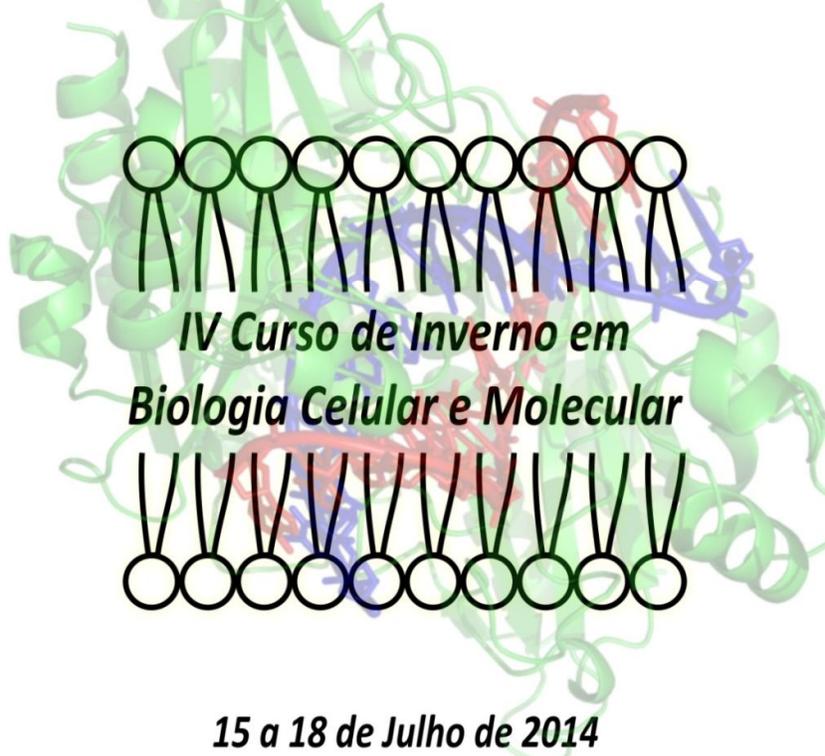
# MINICURSO 4

## COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTI OXIDANTE DE CHÁS COMERCIALIZADOS NO BRASIL



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*

*15 a 18 de Julho de 2014*

**LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA DE MICROORGANISMOS**

**Professores:**

Rosane Marina Peralta

Cristina Giatti Marques de Souza

**Pós-graduandos:**

Roselene Oliveira

Rubia Carvalho G. Correa

Tatiane Brugnari

Jéssica Melo Macoris

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Chá: Histórico e Consumo

Define-se 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.

O chá surgiu na China em 2.375 a.C., durante o império de Sheng Nung. Diz a lenda que deitado à sombra de um arbusto, o imperador acabou adormecendo antes de beber uma taça de água fervida (o imperador mandava ferver toda a água que bebia com medo dos “micróbios”). Uma brisa fez algumas folhas caírem na taça, com a água ainda quente, resultando em chá. Durante séculos, o chá tem sido considerado pelos orientais como uma bebida saudável, sendo utilizado na China há aproximadamente 3.000 anos, sendo este país o seu principal produtor. O chá foi introduzido no ocidente em meados o século XVII, quando os portugueses começaram a desenvolver o comércio com o Oriente. A princesa inglesa Catarina de Bragança levou uma arca de chá como parte de seu dote quando casou com Carlos II. A partir de então, o chá começou a ser um costume inglês reservado à aristocracia e com o tempo ganhou os lares por toda a Inglaterra. Ainda hoje, a hora do chá na Inglaterra (17h) é sagrada.

Desde a pré-história, as plantas têm sido utilizadas como produtos terapêuticos. Em todo mundo milhares de produtos de origem vegetal são utilizados nas mais variadas formas: cataplasmas, infusão, macerado filtrado, tinturas, unguentos, pomadas, xarope, cápsulas e na sua forma in natura. O chá é utilizado por infusão que é a forma mais popular dos diferentes produtos de origem vegetais. Os chás são ricos em compostos biologicamente ativos (flavonóides, catequinas, polifenóis, alcalóides, vitaminas, sais minerais) que contribuem para a prevenção e o tratamento de várias doenças. (TREVISANATO; KIM, 2000).

Os chás têm atraído muita atenção nos últimos anos devido a sua capacidade antioxidante e sua abundância na dieta de milhares de pessoas em

todo o mundo. São ricas em catequinas, flavonoides que apresentam propriedades biológicas, como atividades antioxidante e sequestradora de radicais livres. Os chás ingeridos na forma de infusão contribuem para a extração dos compostos fenólicos, considerados benéficos à saúde (BUNKOVA *et al.*, 2005). Devido a uma tendência orientalista e suas propriedades antioxidantes, o interesse do consumidor ocidental é cada vez maior.

O chá verde e o chá preto são largamente consumidos no Brasil e são preparados com folhas da mesma planta, *Camellia sinensis*. A diferença entre o chá verde e o preto está no método de tratamento das folhas, uma vez que ambos são obtidos da mesma planta (TREVISANATO; KIM, 2000). Para o preparo do chá preto, as folhas são fermentadas. Para o preparo do chá verde, as folhas são apenas escaldadas e fervidas para garantir a preservação da cor. O chá preto é responsável por 75% do chá consumido no mundo e o chá verde, por apenas 22%. O chá verde e preto estão para a China assim como o chá mate para o Brasil. Ele é o mais consumido, principalmente na versão tostada.

## 1.2. Radicais Livres e Antioxidantes

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997). Algumas espécies de radicais livres:

- $^1\text{O}_2$       oxigênio singlete
- $\text{O}_2^-$       radical superóxido
- $\text{OH}\cdot$       radical hidroxila
- $\text{NO}\cdot$       óxido nítrico
- $\text{ONOO}^-$    peroxinitrito
- $\text{Q}\cdot$       radical semiquinona

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (YU & ANDERSON, 1997). Entre as principais formas reativas de oxigênio o  $O^{2-}$  apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o OH. mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O  $H_2O_2$  não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (Anderson, 1996).

A formação de radicais livres in vivo ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição à fatores exógenos (radiação ultravioleta, cigarro, dieta entre outros). Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo.

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos . Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES & STAHL, 1995).Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos.

**Quadro 1:** Principais agentes de defesa antioxidante.

<b>Não-enzimático</b>	<b>Enzimático</b>
$\alpha$ -tocoferol (vitamina E)	superóxido dismutase
$\beta$ -caroteno	catalase
Ácido ascórbico (vitamina C)	NADPH-quinona oxidoreductase
Flavonóides	glutathiona peroxidase
Proteínas do plasma	enzimas de reparo
Selênio	
Glutathiona	
Clorofilina	
L-cisteína	
curcumina	

### **1.3. Compostos Fenólicos – Flavonóides e Catequinas**

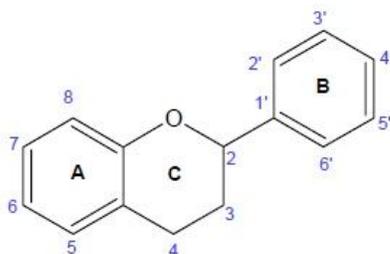
Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de seqüestrar os radicaislivres (DECKER, 1997).

Os flavonóides (Figura 1) representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal, sendoamplamente distribuídos em frutas, vegetais, sementes, flores e cascas de árvores, portanto parte integrante da dieta humana (COOK; SAMMAN, 1996). Estes compostos apresentam uma forma estrutural característica, o núcleo tricíclico. São conhecidos mais de 4.200 tipos de flavonóides, apresentando propriedades medicinais importantes como: ação antioxidante, anti-inflamatória.

Os compostos fenólicos podem inibir os processos da oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (DECKER, 1997). Os flavonoides atuam na inativação dos radicais livres em ambos os compartimentos celulares lipofílico e hidrofílico. Esses compostos tem a

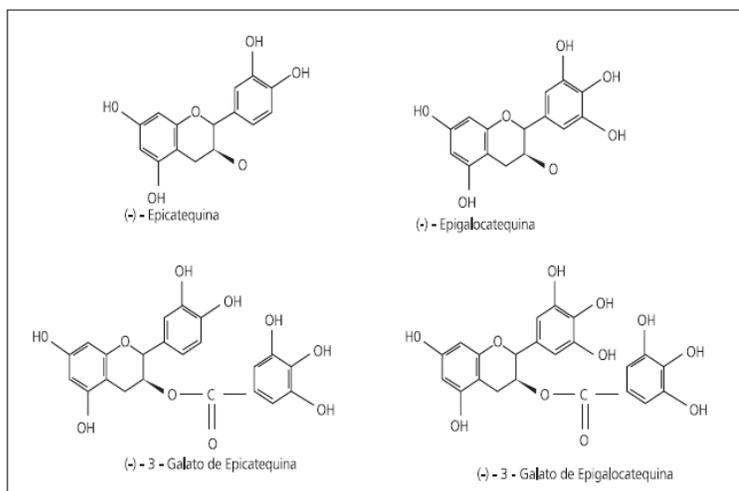
capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres. (HARTMAN E SHANKEL, 1990).

Os flavonóides e as catequinas são os principais componentes químicos terapêuticos da planta *C. sinensis*, sendo potentes antioxidantes, scavengers de radicais livres, quelantes de metais e inibidores da lipoperoxidação. Suas propriedades estão relacionadas com a presença, em sua estrutura, de radicais ligados aos seus anéis. A presença de grupos hidroxil na posição carbono 3 do anel C, de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C e o número de radicais hidroxil ligados nos anéis A e B, aumentam sua atividade antioxidante (COOK; SAMMAN, 1996; ANGHILERI; THOUVENOT, 2000).



**Figura 1.** Fórmula estrutural característica dos Flavonóides ( $C_6 C_3 C_6$ ).

A classe das catequinas (Figura 2) inclui a: epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), galato-3-epicatequina (ECG), galato-3-epigalocatequina (EGCG). As catequinas correspondem a, aproximadamente, 26,7% dos compostos presentes no chá verde, das quais 11% são constituídos de EGCG, 10% de EGC, 2% de ECG, 2,5% EC e 15% de polifenóis não identificados. O potencial quimioprotetor/antioxidante das frações das catequinas do chá verde apresenta a seguinte ordem decrescente de eficiência: EGCG = ECG > EGC = EC (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996)



**Figura 2.** Catequinas chá verde

## 2. MATERIAIS E METODOS

### 2.1. Materiais

Serão utilizados extratos de chás industrializados adquiridos em estabelecimento comercial de Maringá-PR e identificados como chá verde, chá preto e chá mate. São folhas secas, trituradas até textura de pó fino e acondicionadas em saches.

### 2.2. Extração dos Compostos Fenólicos

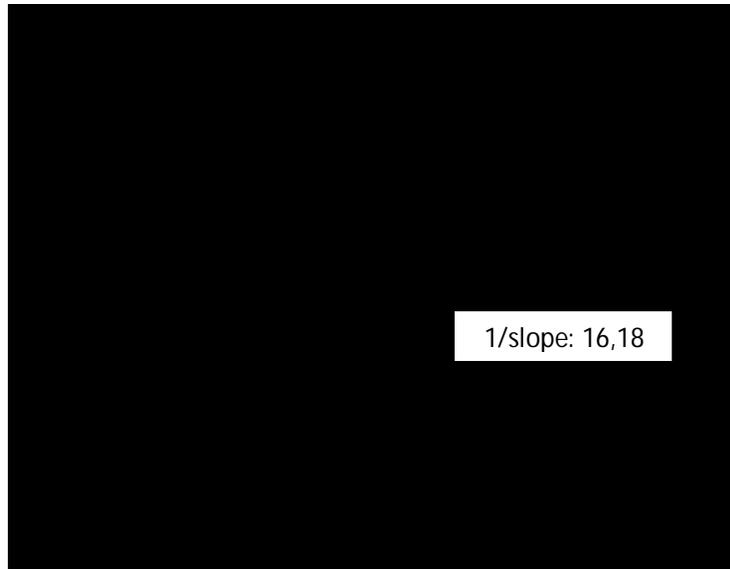
- Extrato - Pesar o conteúdo de 1 sachê e colocar em 1 frasco Erlenmeyer. Adicionar 100 mL de água destilada e manter sobre agitação de 120rpm por 1h a temperatura ambiente. Filtrar e congelar o material para liofilização. *(Esta etapa já foi previamente realizada devido à curta duração do minicurso).*

### 2.3. Determinação de Compostos Fenólicos pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu

Metodologia proposta por SINGLETON & ROSSI (1965).

- **Amostra:**
  - Pipetar 10, 25 e 50  $\mu\text{L}$  do extrato - chá em diferentes tubos (trabalhar em duplicata);
  - Completar o volume para 2,0 mL com água destilada;
  - Pipetar 300  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,9M;
  - Pipetar 100  $\mu\text{L}$  do reagente fenol de Folin-Ciocalteu 1 mol/L;
  - Agitar os tubos e acondicioná-los ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, por 1 horas. A absorbância deve ser medida em 725 nm.
- **Branco:**
  - Mesmo procedimento da amostra, apenas adicionar 2,0 mL de água aos tubos.
  - Deve ser feito em duplicata, usado para zerar o espectrofotômetro.

Será utilizada uma curva padrão de catequina (Figura 3) para a quantificação dos fenóis. Os resultados serão expressos em equivalentes de catequina, ou seja, a quantificação dos fenólicos será feita em  $\mu\text{g}$  de equivalentes de catequina por ml de extrato.



**Figura 3:** Curva padrão de catequina para quantificação de fenólicos totais.

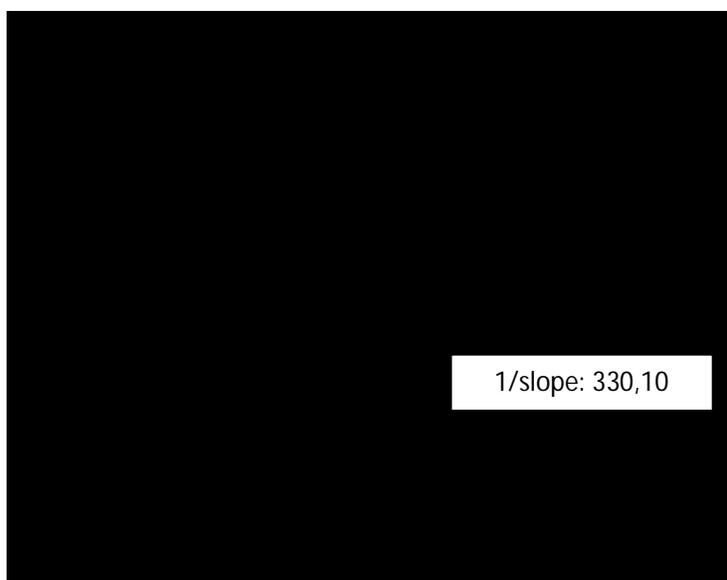
#### **2.4. Determinação de Flavonóides Totais**

Metodologia proposta por ALOTHMAN et al. (2009) com ligeiras modificações.

- **AMOSTRA:**
- Pipetar 250  $\mu\text{L}$  do extrato - chá (trabalhar em duplicata);
- Adicionar 1000  $\mu\text{L}$  de água destilada;
- Pipetar 75 $\mu\text{L}$  de uma solução  $\text{NaNO}_2$  5% em água;
- Aguardar 5 minutos;
- Pipetar 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  10% em água;
- Aguardar 6 minutos;
- Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  1 mol/L;
- Adicionar 600  $\mu\text{L}$  de água destilada.
- Agitar vigorosamente (em vortex);
- Ler a absorvância em 510 nm contra o branco.

- **BRANCO:**
- Mesmo procedimento da amostra, apenas adicionar 1,250 mL de água aos tubos.
- Deve ser feito em duplicata, usado para zerar o espectrofotômetro.

Será utilizada uma curva padrão de catequina (Figura 4) para a quantificação dos flavonóides. Os resultados serão expressos em equivalentes de catequina, ou seja, a quantificação dos flavonóides será feita em ug de equivalentes de catequina por ml de extrato.



**Figura 4:** Curva padrão de catequina para quantificação de flavonóides totais.

## **2.5. Determinação da atividade antioxidante através da atividade sequestrante de radicais livres ABTS<sup>+</sup>**

### **2.5.1. Preparo da solução estoque:**

Preparar duas soluções:

- ABTS 7,4 mM ( 0,008g de ABTS diluido em 2mL de água)
- Persulfato de potássio 2,6 mM (0,007g em 10mL de água)

- Misturar os 2 reagentes em frasco âmbar em volumes iguais e deixar por 12h no escuro e a temperatura ambiente. Irá formar solução ABTS+ catiônica

### 2.5.2. Preparo da solução de trabalho:

- Após 12h retirar 1,0mL da solução e diluir em 59 mL de metanol. Utilizar luva para manipular o metanol e a solução metanólica.
- Medir a absorbância a 734 nm. A Abs deverá ser de 1,1. Caso ocorra uma Abs maior ou menor, esta deve ser ajustada pela adição de solução estoque ou metanol, conforme a necessidade.
- Sempre utilizar a solução fresca de ABTS. Esta não deve ser usada após 24h de preparo.  
*(As etapas 1 e 2 já foram previamente realizadas devido à curta duração do minicurso).*

- **AMOSTRA:** Preparar uma solução contendo 1000 ug/ml do extrato e realizar diluição seriada em água destilada (obter 8 concentrações) posteriormente pipetar 150 µL de extrato e adicionar 2850 µL de solução de ABTS;
- **CONTROLE (-):** 150 µL de água + 2850 µL de solução de ABTS;
- **CONTROLE (+):** 150 µL de BHT 0,02% em metanol + 2850 µL de solução de ABTS;

Os tubos devem ser mantidos ao abrigo da luz por 2h a temperatura ambiente.

Ler a Abs a 734 nm zerando o aparelho com metanol.

### 2.6. Cálculo da atividade sequestrante de radicais ABTS<sup>+</sup>(%)

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

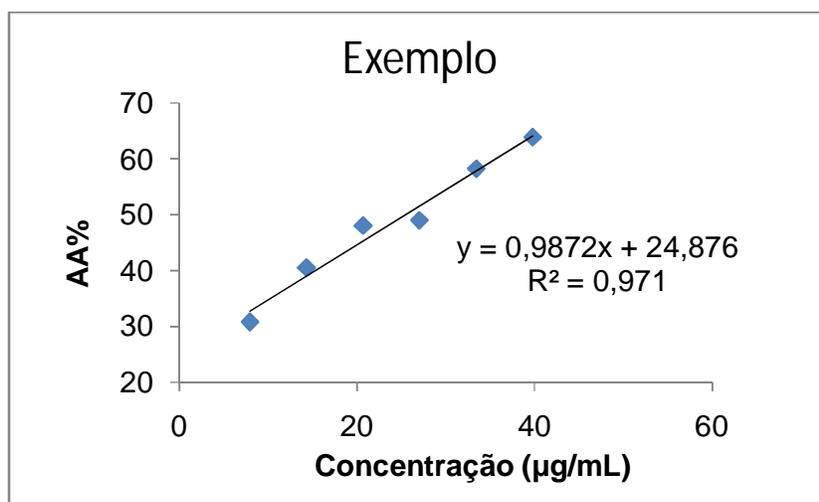
onde  $Abs_{amostra}$  é a absorvância da amostra e  $Abs_{controle (-)}$  é a absorvância do controle negativo.

## 2.7. CÁLCULO DO EC<sub>50</sub>

A **capacidade antioxidante** da mostra será expressa em **EC<sub>50</sub>**, que corresponde à concentração de antioxidante necessária para reduzir o valor original do radical livre em 50%, e que tem por unidade µg/mL. Quanto menor o valor de EC<sub>50</sub>, maior a capacidade antioxidante da amostra.

O valor de EC<sub>50</sub> é calculado por regressão linear de parcelas, onde a abscissa corresponde às concentrações dos extratos testados e a ordenada às porcentagens de atividade antioxidante obtidas no ensaio (Figura 5)

Para o cálculo do EC<sub>50</sub>, considerar que as amostras já sofreram uma diluição de 20x no método.



**Figura 5:** Exemplo de cálculo para EC<sub>50</sub>

$$\text{Cálculo EC}_{50} \text{ (exemplo): } 50 = 0,9872x + 24,876 \Rightarrow x = 25,45 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

## 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGHILERI, L., J., Thouvenot, P., Natural polyphenols- iron interaction: its biological importance. Biological Trace Element Research. Clifton, v.73,p.251-258, Mar 2000.

- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- BUNKOVA, R., Marova, I., Nemeč, M. Antimutagenic properties of green tea. *Plant Foods Hum Nutr* 60: 25-9, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº. 277, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br> Acesso em: 8 mar. 2008.
- CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, London, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Stoneham, v.7, n.2, p.66-76, Sep. 1996.
- DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews*, New York, v.55, n.11, p.396-407, 1997.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, New York, v.52, n.8, p.253-265, 1994.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Stoneham, v.7, n.2, p.66-76, Sep. 1996.
- POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *International Rev. Nutr.*, Campinas, 12(2): 123-130, maio/ago., 1999 *Journal of Vitamin and Nutrition Research*, Bern, v.67, .5, p.289-297, 1997.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v.20, p.933-956, 1996.
- SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.16, p.144-158, 1965.
- TREVISANATO, S. I.; KIM, Y. I. Tea and Health. *Nutrition Reviews*, New York, v.58, p.1-10, Jan, 2000.
- YU, T-W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species-- induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research*, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997.

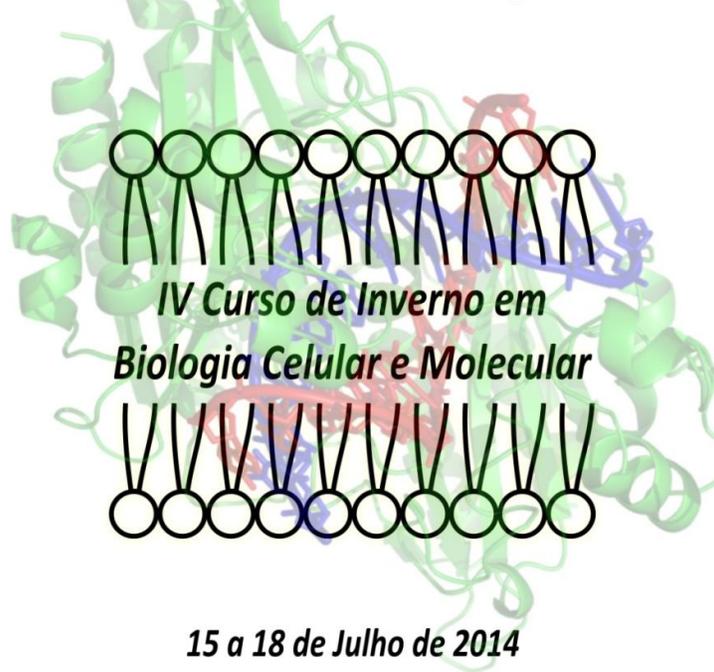
# MINICURSO 5

## TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS INSETICIDAS E ANÁLISE GENÉTICA-BIOQUÍMICA EM INSETOS-PRAGA



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*

*15 a 18 de Julho de 2014*

**LABORATÓRIO DE GENÉTICA ANIMAL**

**Professor:**

Ana Sílvia Lapenta

**Pós-graduandos:**

Alison Henrique Ferreira Julio

Sandro Daniel Drosdoski

## 1. INTRODUÇÃO

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

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

Em 1939 um inseticida do grupo dos hidrocarbonetos clorados, o diclorodifeniltricloroetano, amplamente conhecido como DDT, foi apresentado como a grande solução para a eliminação dos insetos. A descoberta do DDT passou a representar um marco histórico, de grandes investimentos econômicos no desenvolvimento de compostos inseticidas. Este acontecimento foi logo seguido pelo desenvolvimento dos organofosforados, os quais tinham sido descobertos desde a década de 30. Em seguida, nos anos 50 os carbamatos e, entre os anos 60 e 70 os piretróides.

Desde então, os inseticidas químicos desempenham um importante papel no controle de insetos vetores.

No entanto, o uso indiscriminado destes compostos, tem contribuído para que os insetos desenvolvam mecanismos de resistência, que permitem a eles, suportarem doses cada vez maiores de compostos que seriam letais para a maioria dos indivíduos da população. A resistência aos inseticidas químicos afeta direta e profundamente a reemergência de doenças transmitidas por vetores, principalmente aquelas em que não é possível a cobertura vacinal para garantir a proteção da população humana, bem como na produção alimentícia, causando danos e prejuízos incalculáveis.

## 1.1. Controle Químico - Uma “prática” Milenar

O uso de inseticidas químicos é, seguramente, uma prática de caráter secular. Relatos do uso de compostos químicos datam desde antes do ano 2.500 a.C., em que os sumérios aparentemente utilizavam compostos sulfúricos para o controle de insetos. Os chineses, em 1.200 a.C., utilizavam compostos arsênicos e mercúrio como inseticidas. Em *Historia Naturalis*, de Plínio – o Ancião, há uma descrição que inclui um resumo de práticas de controle de pragas, extraídas da literatura grega, as quais datam do ano 70 a.C.

Registros de uso de um pó básico à base de flores de piretro datam de 1697, quando asiáticos sabiam do poder inseticida de espécies do gênero *Pyrethrum* (*Pyrethrum carneum* e *Pyrethrum roseum*). O uso do arsênico verde de Paris e soluções de querosene deram início à era da aplicação em larga escala de inseticidas químicos como controle de insetos e pragas.

Entre 1920 e 1930, uma ampla variedade de compostos sintéticos foi descoberta como potencial arma para o controle de mosquitos, levando a uma massiva utilização desses produtos em todo o mundo. Os anos seguintes foram marcados, principalmente, pelo começo da Segunda Guerra Mundial e pela necessidade de se controlar piolhos que assolavam as trincheiras. Cientistas procuraram avidamente novos produtos que pudessem ser aplicados em roupas e no corpo, e mais do que isso prevenisse reinfestações do inseto por longos períodos. Vários compostos foram testados em vão. Em 1939 o DDT, foi apresentado pelo químico suíço Paul Müller, como a grande promessa de eliminação dos insetos. O DDT tornou-se o composto químico mais famoso e mais utilizado do século 20, levando o Dr. Müller ao Prêmio Nobel de Medicina em 1948. Logo em seguida, os organofosfatos foram sintetizados na Alemanha. No início da década de 50, os carbamatos na Suíça e, entre 1960-1970, os piretróides foram descobertos no Japão e no Reino Unido.

Efeitos adversos, principalmente pelo uso indiscriminado e excessivo de compostos químicos, levaram os cientistas a procurar novas alternativas para controlar vetores. Compostos alternativos, tais como reguladores de crescimento (IGRs), inibidores de quitina e modificadores de comportamento de insetos foram sintetizados e até hoje ainda são testados. Pesquisas extensivas

também foram direcionadas ao uso de inseticidas biológicos à base de vírus, bactérias, fungos, parasitos, entre outros. Entretanto, até o momento apenas os inseticidas à base de bactérias entomopatogênicas tornaram-se amplamente utilizados no controle de vetores.

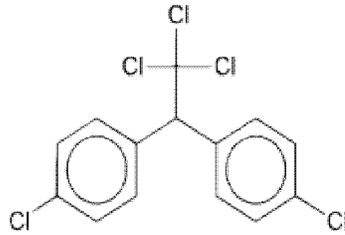
## **1.2. Inseticidas**

Inseticidas químicos podem ser classificados de várias maneiras. A primeira delas é de acordo com o grupo químico ao qual pertencem, sendo conhecidos os hidrocarbonetos clorados ou organoclorados, carbamatos, piretróides e organofosforados. A segunda forma de classificação está de acordo com o modo de ação: a primeira geração de inseticidas é caracterizada por compostos que acometem o aparelho digestivo, como o arsênico; a segunda geração é composta pelos inseticidas de contato, como os organoclorados, carbamatos, piretróides e organofosforados; a terceira geração é composta por compostos de ação fisiológica, como os hormônios juvenis e seus análogos.

## **1.3. Principais classes de Inseticidas**

### **1.3.1. Organoclorados**

Carbono, hidrogênio e cloro são os três elementos que caracterizam esta classe de inseticida. Os organoclorados possuem estabilidade química, baixa solubilidade em água, estabilidade moderada em solventes orgânicos e uma baixa pressão de vapor. Por tais características, esta classe de inseticida é altamente persistente, podendo ocasionar contaminações em longo prazo do meio ambiente e bioacumulação gradual em animais. O DDT, principal representante do grupo dos organoclorados, é caracterizado por possuir amplo espectro de atividade tóxica, alta persistência, risco ao meio ambiente/humanos. Devido a estas características, o DDT passou de inseticida mais utilizado no século 20 para o mais inapropriado no século 21.



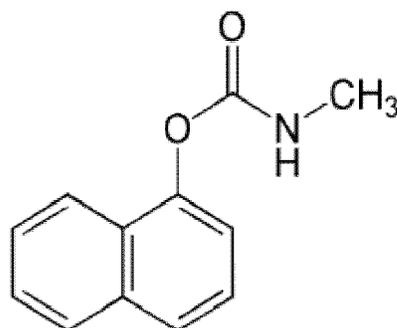
**Figura 1:** Estrutura molecular do DDT

Insetos susceptíveis expostos ao DDT costumam apresentar tremores por todo o corpo, hiperexcitabilidade e consequente perda do movimento, também chamada de ataxia. Ao agir no sistema nervoso do inseto, o DDT age no equilíbrio dos íons potássio dos neurônios sensoriais, causando os disparos aleatórios e impedindo a passagem normal do impulso nervoso. O efeito pós-potencial em gerar disparos repetitivos, depende das propriedades do canal de sódio da fibra nervosa. O DDT interfere na atividade estabilizadora dos íons  $\text{Ca}^{++}$  presentes na superfície axonal dos insetos, interferindo assim no processo de estabilização membranar. Essa cadeia de acontecimentos é transmitida para o resto do sistema nervoso, causando contorsão muscular, a qual é geralmente procedida por convulsão e morte do indivíduo.

### 1.3.2. Carbamatos

Os inseticidas da classe dos carbamatos são derivados do ácido carbâmico, tendo sua introdução no mercado em 1951, pelas Indústrias Químicas Geigy da Suíça. O primeiro carbamato natural foi descoberto em uvas africanas, em meados do século 19, entretanto, por apresentar instabilidade química, o seu análogo sintético veio a ser produzido. Possuem um amplo espectro de atividade inseticida, agindo por contato ou nas paredes do estômago, e seu uso é efetivo em populações resistentes aos organoclorados e organofosforados. Seu modo de ação é através da inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima que cataliza a hidrólise da acetilcolina (ACh) – um neurotransmissor atuante nas sinapses neuronais do sistema nervoso central. Com a inibição da AChE, a acetilcolina fica acumulada, prolongando a sua ação. Em insetos, o resultado é uma

hiperexcitabilidade do sistema nervoso, seguido de convulsão, paralisia e conseqüente morte do inseto tratado.

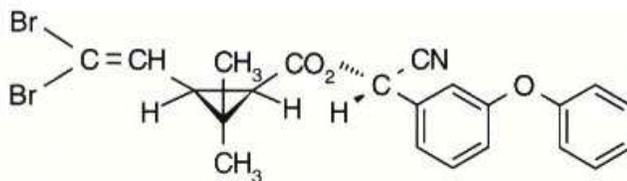


**Figura 2:** Estrutura molecular do Carbaril

### 1.3.3. Piretróides

Os piretróides representam uma nova geração de inseticidas sintéticos. Naturalmente extraídos do ápice da flor do *Chrysanthemum sp.*. A primeira produção comercial do produto foi feita em Dalmatia (Croácia) em 1840. Devido a sua baixa toxicidade em humanos, são geralmente utilizados sob a forma de sprays residuais – seja em telas, cortinas ou paredes. Os piretróides praticamente substituíram/suplementaram o uso das outras três classes de inseticidas em diversas áreas de controle de pragas e hoje, representam aproximadamente 25% do mercado de inseticidas químicos no mundo.

Nos últimos anos um grande número de compostos piretróides foi sintetizado, sendo alguns destes extremamente potentes.



**Figura 3:** Estrutura molecular da Deltametrina

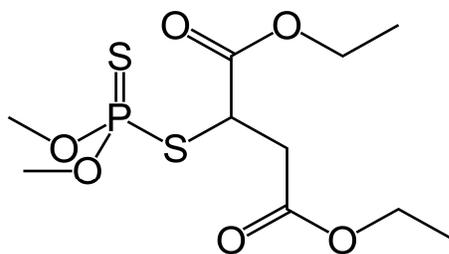
Piretróides são neurotóxicos para os insetos. Mosquitos tratados com piretróides apresentam um quadro de hiperexcitabilidade, descoordenação e

paralisa; insetos alados são rapidamente nocauteados. Os sintomas exatos nos insetos vão depender da dose utilizada. Ao agir na membrana nervosa, os piretróides modificam canais de sódio, provavelmente obstruindo mudanças conformacionais protéicas na interface lipídio-proteína da membrana. Tipicamente, o inseto apresenta disparos repetitivos e bloqueio da transmissão neuromuscular. A ação letal dos piretróides provavelmente envolve neurônios periféricos e centrais, enquanto que o efeito *knockdown* (nocaute) é produzido por efeitos de intoxicação periférica.

#### **1.3.4. Organofosforados**

Os organofosforados também são conhecidos por fosforados orgânicos, inseticidas fosforados, ésters fosfóricos ou ésteres de ácido fosfórico.

Organofosforados são comumente utilizados como um termo genérico, pois inclui todos os inseticidas que contenham fósforo. Possuem duas características marcantes: uma baixa estabilidade química e uma maior toxicidade a vertebrados do que os organoclorados. Por possuírem baixa persistência, foram bastante utilizados como método alternativo aos persistentes organoclorados, particularmente o DDT. Esta classe de inseticidas é conhecida por produzir grande acúmulo da acetilcolina (ACh) nas terminações nervosas. A acetilcolina é um importante neurotransmissor que em condições normais, o organismo a destrói, pela ação da colinesterase (ChE). Em insetos expostos a esses compostos, a colinesterase é inibida, fazendo com que os níveis de acetilcolina se elevem. Essa inibição é praticamente irreversível, o que difere da ação dos carbamatos, que mesmo tendo o mesmo alvo, a inibição é reversível com o tempo. Com a inibição da ChE, há um acúmulo de acetilcolina no organismo produzindo sinapses aleatórias, distorção muscular e paralisia do inseto.

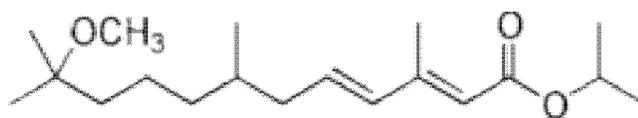


**Figura 4:**Estrutura molecular do malathion

## 1.4. Algumas das novas classes de inseticidas

### 1.4.1. Análogos do Hormônio Juvenil

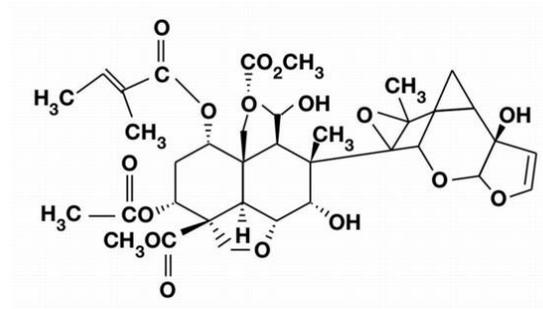
Prejudicam o desenvolvimento dos insetos, em especial nos processos de metamorfose.



**Figura 5:**Estrutura molecular do Methoprene.

### 1.4.2. Análogos do Hormônio da Ecdise

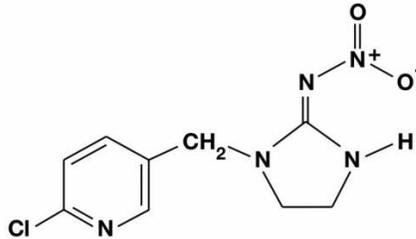
Prejudicam o desenvolvimento dos insetos, em especial no processo de muda, primordial para o crescimento.



**Figura 6:**Estrutura molecular da Azadiractina

### 1.4.3. Neonicotinóides

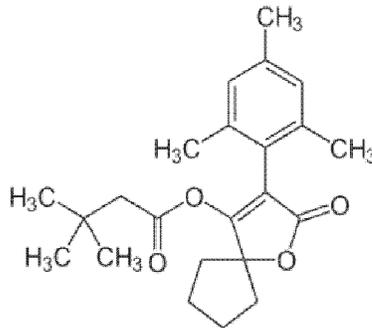
Agem nos receptores nicotínicos de Acetilcolina, bloqueando-os, impedindo a transmissão sináptica.



**Figura 7:** Estrutura molecular da Imidacloprida

### 1.4.4. Cetoenóis

Nova classe de inseticida, como por exemplo o Espiromesifeno, que age na enzima Acetil-CoA Carboxilase alterando o metabolismo de lipídios.



**Figura 8:** Estrutura molecular do Espiromesifeno

## 1.5. A resistência aos inseticidas químicos

Inseticidas químicos desempenham um papel fundamental em programas de controle de vetores desde o início do século 20. A resistência aos inseticidas químicos já se encontra documentada em mais de 504 espécies de artrópodes. Infelizmente, a grande maioria desses registros foi realizada após falhas ao tentar controlar determinado inseto, e não como um estudo prévio antecipando-se a tais erros.

A resistência é uma característica hereditária, e sendo assim, uma outra definição de resistência dentro de um contexto genético é a de Crow (1957) que define a resistência como "o marco na mudança da composição genética de uma determinada população em resposta à pressão de seleção". O processo determinante no desenvolvimento da resistência é a pressão contínua de seleção, ou seja, o uso freqüente de um determinado pesticida. Trata-se de um caso típico de evolução Darwiniana; ou seja, a aplicação constante de um mesmo produto químico aumenta a freqüência relativa de alguns indivíduos "pré-adaptados" presentes em uma população.

Dentre as conseqüências drásticas da evolução da resistência estão a aplicação mais freqüente de pesticidas; aumento na dosagem do produto; e substituição por um outro produto, geralmente de maior toxicidade. Estes fatores comprometem os programas de controle de vetores em vista da maior contaminação do meio ambiente com pesticidas, destruição de organismos benéficos, e elevação nos custos para obter os níveis aceitáveis de controle. Sabe-se também que a descoberta e o desenvolvimento de novos compostos está se tornando cada vez mais difícil e caro. Associado a estes fatores, existe a possibilidade das populações alvo apresentarem resistência cruzada para os novos compostos. Sendo assim, o manejo da resistência de artrópodes aos produtos químicos tem se tornado um importante componente do controle vetorial.

## **1.6. Mecanismos de resistência em insetos**

Os mecanismos de resistência podem ser divididos em quatro categorias: penetração reduzida, mudanças comportamentais, alteração do sítio-alvo e resistência metabólica.

### **1.6.1. Penetração reduzida**

Mudanças na cobertura de quitina do inseto podem significar uma diminuição na penetração do inseticida. Insetos que desenvolvem este tipo de

mudança não apresentam altos níveis de resistência, mas quando associada a outros mecanismos, o nível de resistência aumenta consideravelmente.

### **1.6.2. Mudanças comportamentais**

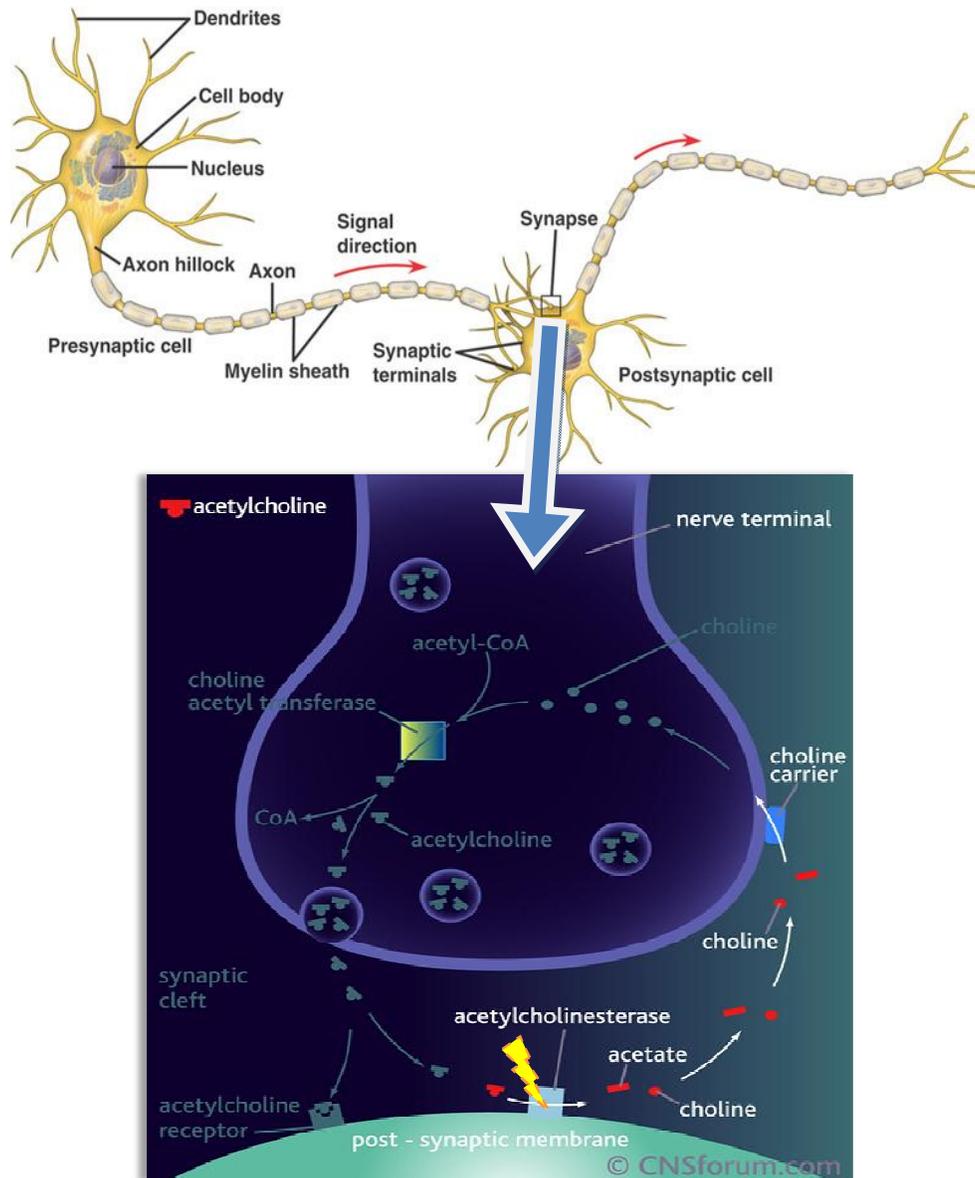
Insetos podem apresentar mudanças de comportamento em áreas tratadas. Estas mudanças podem fazer com que reconheçam superfícies tratadas com inseticidas, apresentando maior tendência de não adentrar em áreas sob tratamento.

### **1.6.3. Alteração do sítio-alvo**

Este tipo de resistência é ocasionada por mutações em genes que codificam para o sítio de ação do inseticida, impedindo/dificultando assim a ligação do inseticida com sua molécula-alvo. Estas alterações podem comprometer parcialmente ou integralmente a atividade inseticida em questão. A enzima acetilcolinesterase, o receptor neuronal do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e os canais de sódio dependentes de voltagem, são exemplos de sítios-alvos envolvidos neste tipo de resistência.

- **Acetilcolinesterase insensível:** Como mencionado anteriormente, inseticidas organofosforados e carbamatos são neurotóxicos, que agem inibindo a enzima acetilcolinesterase.

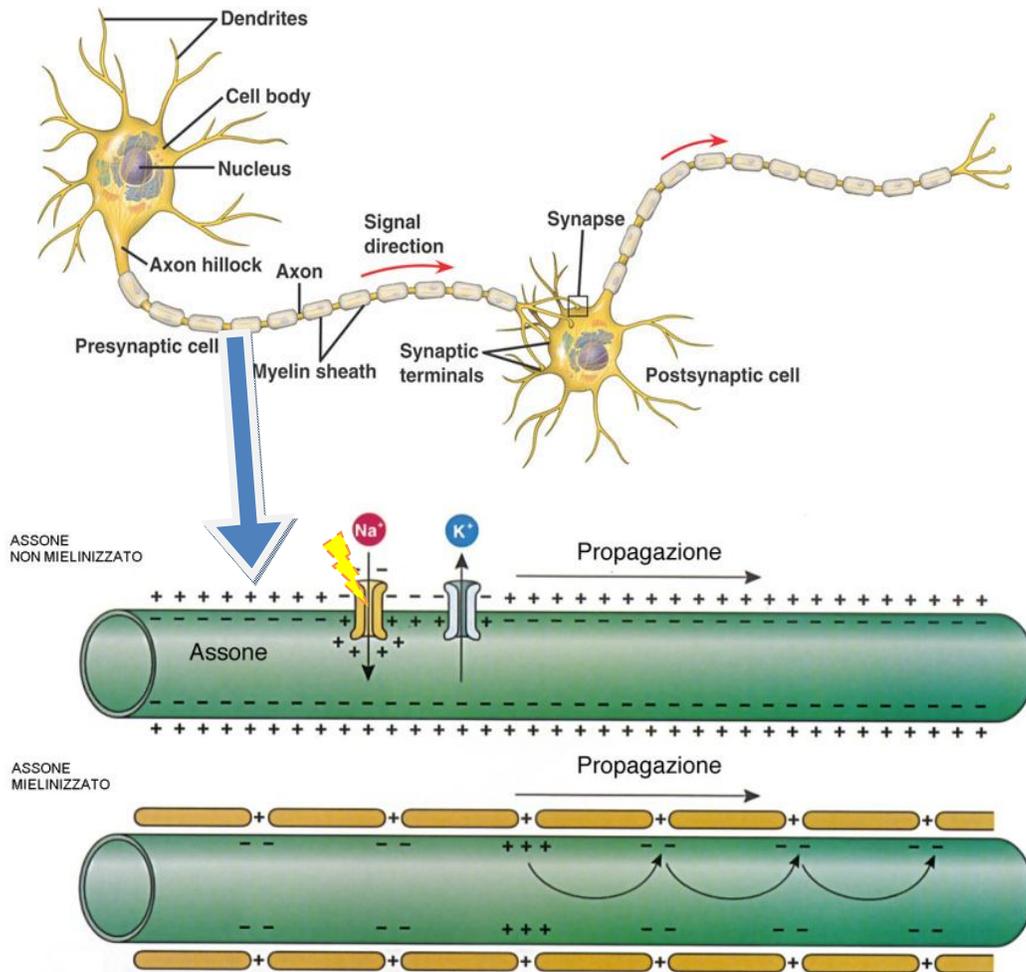
A AChE possui um papel fundamental no sistema nervoso central, finalizando o impulso nervoso pela catalisação da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Apesar deste tipo de resistência já ter sido detectado, através de ensaios bioquímicos, em várias espécies vetoras.



**Figura 9:**Fenda Sináptica e Acetilcolinesterase, alvo de Carbamatos e Organofosforados.

- **Mutação no receptor GABA:**O sítio de ação dos inseticidas organoclorados, como o dieldrin, é o receptor neuronal do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). A ligação do GABA ao seu receptor, composto por cinco subunidades, resulta na rápida abertura de um canal iônico cloro-seletivo. A insensibilidade do receptor GABA já foi bem estudada em várias espécies de insetos.

- **Mutações no canal de sódio dependentes de voltagem.** O efeito farmacológico do DDT e piretróides consiste em causar ativação constante dos canais de sódio. Este efeito é conhecido por nocaute, do inglês “knock-down”.



**Figura 10:** Canais de Sódio dependentes de voltagem, alvo dos piretróides.

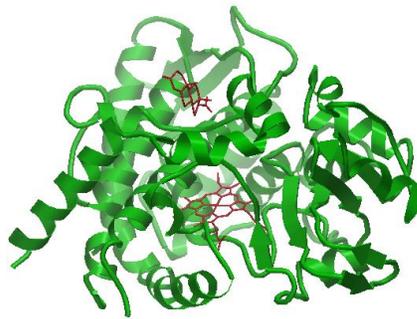
O intenso uso de piretróides e DDT levaram populações de vários tipos de insetos, incluindo *Anopheles* e *Aedes*, a desenvolverem resistência do tipo *Kdr* (*knockdown resistance*).

## 1.7. Resistência metabólica

A resistência metabólica é o resultado de uma mudança estrutural na molécula da enzima que aumenta sua habilidade em detoxificar o inseticida e/ou, elevação nos níveis da enzima produzida. Um pequeno grupo de enzimas ou família de enzimas está envolvido neste mecanismo de resistência: as oxidases, as glutationa-s-transferases e as esterases.

### 1.7.1. Oxidases

A citocromo P450 faz parte de uma família complexa de enzimas encontradas desde bactérias até mamíferos. São responsáveis pelo metabolismo oxidativo de vários compostos endógenos e exógenos.



**Figura 11:** Estrutura tridimensional de um Citocromo P450

Há relatos de resistência mediada por tipos diferentes de P450 oxidases para todas as classes de inseticidas, mas nem todas as famílias de P450 são capazes de se ligar e conseqüentemente degradar o inseticida. Vários trabalhos ressaltam níveis elevados de P450s das famílias CYP4, CYP6 e CYP12 em amostras de insetos resistentes, mas apenas em poucos é estabelecida uma relação entre uma P450 específica e alto metabolismo de inseticida. Níveis elevados de atividade da monoxidase P450, em mosquitos resistentes, são freqüentemente encontrados em associação com atividade alterada de outras enzimas. Brogdon (1999) relatou a resistência contra a cipermetrina, causada por oxidase e esterase em *Anopheles albimanus*.

### 1.7.2. Glutathione S-transferases (GSTs)

Estas enzimas pertencem a uma ampla família de enzimas multifuncionais, envolvidas na detoxificação de uma variedade de compostos – incluindo os inseticidas. Há duas classes de GSTs, classificadas de acordo com sua localização na célula: microsomal e citosólica. Propriedades imunobiológicas, relação filogenética, e estrutura terciária também são empregadas na classificação.



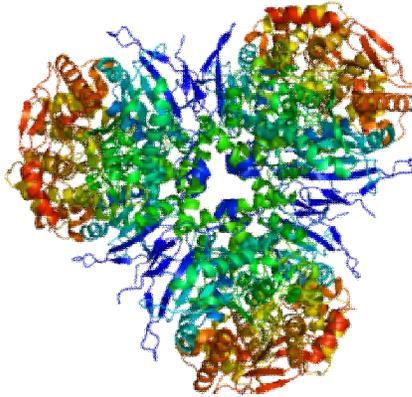
**Figura 12:** Estrutura tridimensional de uma Glutathione S-transferase

Estas enzimas desempenham importante função no estresse fisiológico, estando também implicadas no transporte intracelular e cascatas biosintéticas. Níveis elevados de GSTs, em amostras de insetos resistentes aos organofosforados, foram originalmente relatadas por Hayes e Wolf (1988). No entanto, a elevada atividade das GSTs em insetos tem estado associada aos mecanismos de resistência a todas as quatro classes de inseticidas químicos. A atividade enzimática elevada ocorre, na maioria das vezes, devido ao aumento da concentração de uma ou mais enzimas GSTs, não sendo um resultado da amplificação gênica.

### 1.7.3. Esterases

São enzimas que, em insetos, desempenham papel no sistema nervoso central, na proteólise, no metabolismo hormonal, entre outros. Em uma grande variedade de mosquitos, a atividade elevada das esterases tem sido reportada como o principal mecanismo de resistência aos inseticidas organofosforados. Esta atividade é resultante de uma superprodução de esterases não-

específicas, as quais capturam a molécula do inseticida antes que a mesma alcance seu alvo: a acetilcolinesterase.



**Figura 13:** Estrutura tridimensional de uma Carboxilesterase.

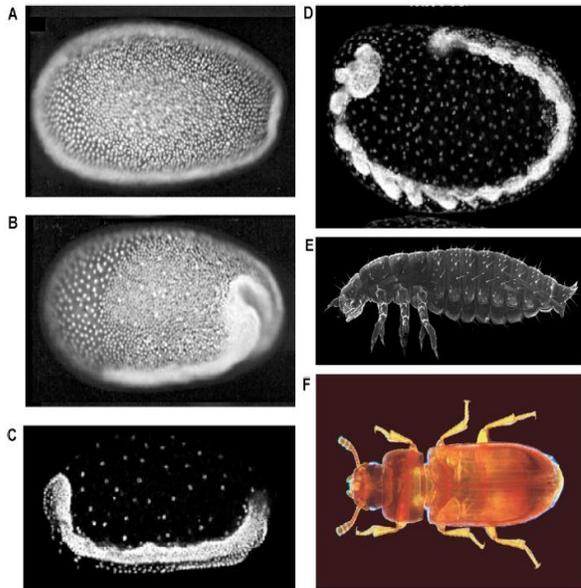
As esterases podem gerar dois tipos de resistência a inseticidas químicos: uma resistência de grande amplitude através de uma rápida ligação ao inseticida (seqüestro) ou uma resistência de amplitude menor através da metabolização de uma variedade pequena de inseticidas que contenham uma ligação éster em comum. Em geral, a elevação dos níveis de esterases que seqüestram a molécula do inseticida se dá por amplificação gênica.

## **1.8. Insetos Praga de Grãos Armazenados atualmente estudados no Laboratório de Biotecnologia e Genética Animal**

### **1.8.1. *Tribolium castaneum***

Por ser os metazoários com maior sucesso evolucionário, os besouros (Coleoptera) possuem luminescência (vagalumes), espirram líquidos defensivos (besouros bombardeiros), mimetizam o visual e comportamento de abelhas e vespas, ou mimetizam quimicamente formigas quando detectam odores de intrusos. Muitos besouros são associados com perdas de milhões de dólares na agricultura e recursos naturais.

O besouro vermelho da farinha, *Tribolium castaneum*, encontrado em grãos e outros alimentos secos que são armazenados, possui tubos de



Estágios de desenvolvimento de *Tribolium castaneum*. **A**, núcleos embrionários iniciais corados, prévia formação da banda na zona de crescimento embrionário. **B**, formação inicial da zona de germinação. **C**, embrião precoce com aproximadamente 4 segmentos, o desenvolvimento da banda na zona de crescimento é visível na região posterior do embrião. **D**, extensão completa do embrião. **E**, larva. **F**, adulto.

Malpighi altamente evoluídos permitindo a eles sobreviver a ambientes extremamente secos. Tem demonstrado resistência a todas as classes de inseticidas usadas no seu combate. Relacionado a essa característica esta uma larga expansão de genes para receptores gustativos, odorantes e proteínas citocromo P450, especificamente devido a duplicação gênica destes dois últimos.

A análise genética em *Tribolium* é facilitada por ser fácil de cultivar, ter um curto ciclo de vida, alta fecundidade, e facilidade para cruzamentos genéticos, permitindo um eficiente quadro genético por meio de químicos mutagênicos e radiação. Como em *Caenorhabditis elegans*, RNA de interferência é sistêmico em *Tribolium castaneum*, facilitando nocaute de produtos gênicos específicos em qualquer tecido e estágio de desenvolvimento.

*Tribolium* é particularmente favorável para estudos de desenvolvimento, sendo mais representativo que outros insetos como *Drosophila*. Em contraste à *Drosophila*, as larvas de *Tribolium* exibem olhos em uma cabeça totalmente formada, e três pares de pernas torácicas. Em adição, *Tribolium* se desenvolve com uma curta embriogênese, onde segmentos adicionais são sequencialmente adicionados na zona de crescimento posterior. Este mecanismo proliferativo de segmentação difere do modelo *Drosophila*, mas assemelha-se com de vertebrados e artrópodes como millipedes. Estas são as

principais características por *Tribolium castaneum* ter sido adotado como besouro modelo.

### **1.8.2. *Sitophilus zeamais* e *Sitophilus oryzae***

Outra das principais pragas de grãos armazenados é o *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) popularmente conhecido como gorgulho do milho. Trata-se de uma praga primária e cosmopolita onde os adultos medem 2,0 a 3,5 mm, de coloração castanho-escuro com manchas claras nos élitros (asas anteriores), bem visíveis após emergência. Possui a cabeça projetada a frente na forma de rostró curvado. Os machos apresentam rostró curto e grosso, as fêmeas apresentam rostró mais longo e afilado.



**Figura 13:** *Sitophilus zeamais*

Esta espécie apresenta infestação cruzada, que é a capacidade de infestar os grãos tanto no campo quanto no armazenamento, elevado potencial de multiplicação e possui muitos hospedeiros como trigo, arroz, milho, cevada e tritcale. Os danos decorrem da redução de peso e da qualidade do grão.

As espécies *Sitophilus zeamais* e *Sitophilus oryzae* Linnaeus 1763 (Coleoptera: Curculionidae) são muito semelhantes em caracteres morfológicos e podem ser distinguidas somente pelo estudo da genitália. Ambas podem ocorrer juntas na mesma massa de grãos, independentemente do tipo de grãos, inclusive podendo cruzar entre si gerando híbridos.

## **1.9. Expressão de isoenzimas e proteínas solúveis totais no desenvolvimento e diferenciação celular**

As células dos organismos eucariotos pluricelulares têm a mesma constituição genética, mas durante o desenvolvimento dos tecidos são acionadas vias metabólicas específicas para a ocorrência dos processos de diferenciação, de modo que tipos diferentes de células, num mesmo organismo culminam em expressar diferentes populações de genes. A expressão desses genes pode, então, ser observada através das mudanças quantitativas ou qualitativas das proteínas dentro das células, uma vez que um dos fatores comuns no desenvolvimento e na diferenciação celular é a capacidade das células perderem e adquirirem características bioquímicas específicas. Portanto, uma das maneiras mais usuais para se estudar a expressão diferencial de genes nos diversos organismos, ou em estágios diferentes do desenvolvimento dos tecidos *in vivo* ou em condições *in vitro*, é através da análise de proteínas solúveis totais e ou de enzimas ou, mais especificamente, de isoenzimas.

As isoenzimas, também referidas como isozimas, foram definidas por Markert e Moller em 1959, e representam formas múltiplas de uma enzima, que atuam sobre um mesmo substrato, mas podem apresentar sequências polipeptídicas, e/ou cargas elétricas, e/ou pesos moleculares, e/ou especificidades e cinéticas diferentes, dentre outras variáveis. Como as frações polipeptídicas, as frações de proteínas totais e as isozimas representam os produtos primários dos genes. Geneticamente, esse tipo de caracterização tem um maior significado; é mais refinado do que as caracterizações morfológicas como forma, tamanho, cor, peso, que geralmente são produtos de mais de um gene associado (interação gênica) a mecanismos diferenciais de expressão e de regulação e a fatores ambientais.

As mudanças graduais de proteínas e de isozimas que acontecem durante o desenvolvimento podem ser demonstradas pelo 'aparecimento' / 'desaparecimento' de moléculas de proteínas e de isozimas individuais. Tais alterações sugerem, também, que os genes envolvidos na síntese dessas moléculas são diferencialmente ativados durante o desenvolvimento. O aparecimento de novas proteínas, ou de enzimas com atividade alterada

durante o desenvolvimento de um organismo, pode ser o resultado tanto de novas sínteses de moléculas, como da ativação de moléculas precursoras.

A atividade das proteínas ou das múltiplas formas de enzimas em um tecido é dependente, dentre outros fatores, da maturidade e do ambiente celular, sendo que o total dessas moléculas, em um organismo, muda durante o desenvolvimento e a diferenciação celular. Os mecanismos exatos de como acontecem essas variações não são totalmente conhecidos; entretanto, é certo que o nível da regulação desses eventos poderia ser diretamente no gene ou na via entre o gene e o seu produto final, que é a proteína funcional. Isso porque, para que os genes se expressem de maneira diferencial, existe uma série de níveis de controle durante o ciclo de vida da maior parte dos organismos. O primeiro controle é a disponibilidade do gene, que por sua vez tem um controle em diferentes níveis, havendo um mecanismo de transcrição diferencial, relacionado à repressão e desrepressão desse gene.

Considerando que o desenvolvimento e os processos de diferenciação dos tecidos de eucariotos podem ser acompanhados através da análise de proteínas e/ou isozimas, essas moléculas devem portanto, ser interessantes para monitorar não somente os processos de diferenciação, mas também os processos de desdiferenciação que ocorrem nos insetos competidores pelo acesso ao alimento com os humanos.

Como as proteínas e as isozimas são moléculas com a mesma natureza química, essas moléculas podem ser nitidamente caracterizadas através de técnicas de cromatografia, como a eletroforese. Por isso, faz-se necessário conhecer os princípios da referida técnica, para poder aplica-la ao estudo da expressão de genes no desenvolvimento de insetos.

#### **1.10. Caracterização de moléculas de mesma natureza química: princípios das técnicas**

A eletroforese é um tipo de cromatografia especial, desenvolvida por Smithies em 1955, que permite um separação mais refinada de moléculas de mesma natureza química, cujo princípio básico é a separação de moléculas em solução, ou em uma matriz sólida, de acordo com seus respectivos pesos moleculares e/ou cargas elétricas. Numa cromatografia convencional, as

moléculas em solução são deslocadas através de um suporte ou matriz, que pode ser desde um simples pedaço de papel absorvente até suportes ou matrizes mais específicas. Acetato de celulose, gel de sílica, resinas específicas são algumas matrizes usadas em colunas de separação por onde deve passar a solução de moléculas.

Numa coluna cilíndrica de cromatografia convencional, a solução é colocada no topo da coluna e bombeada, de modo que a solução atravessa a coluna com uma certa pressão e produz uma taxa de fluxo, ou seja, um certo volume é eluído num determinado tempo. Esse fluxo pode ser mantido constante ou variável, podendo ser mais ou menos pressionado de acordo com os objetivos do trabalho. Ao atravessar a matriz de resinas, geralmente de formas esféricas, as moléculas podem ser selecionadas pelo tamanho: as moléculas menores podem ficar retidas nas malhas esféricas das resinas, também referidas como poros, os quais podem ser de diferentes tamanhos, e as moléculas maiores passam mais rapidamente através da matriz. Por ficarem retidas nos poros da resina, as moléculas menores passam com maior dificuldade. Esse sistema é conhecido como cromatografia em gel.

Por outro lado, o material que constitui a resina pode apresentar cargas + (positivas) ou - (negativas) e reter moléculas de cargas contrárias, caracterizando uma cromatografia de carga iônica. E, ainda, a matriz utilizada pode estar ligada a moléculas específicas como um substrato de uma determinada enzima que se queira isolar, ou a moléculas de anticorpos específicos para uma determinada proteína, caracterizando um sistema de cromatografia por afinidade.

Na cromatografia especial, referida como eletroforese, uma diferença de potencial é aplicada na matriz usada para separar as moléculas, de acordo com o tamanho, a composição das subunidades e as cargas. As matrizes devem ser química e fisicamente inertes, de modo a não interferir na mobilidade das moléculas a serem analisadas. Polissacarídeos purificados como amido, agarose ou poliacrilamida são usuais como matrizes para se fazer eletroforese. A matriz usada para proceder à eletroforese é denominada gel, em razão da forma de preparação e, mais especificamente, da própria consistência final. Gel de amido, gel de agarose, gel de poliacrilamida e a combinação desses são usuais para separar moléculas de proteínas ou ácidos

nucleicos presentes num homogeneizado de células. As diferentes concentrações com que são preparados os géis determinam a porosidade da matriz, permitindo maior ou menor dificuldade para o deslocamento das moléculas.

Para estabelecer um campo elétrico na matriz, o gel deve ser colocado com uma solução tamponante contida em recipientes (cubas) com eletrodos positivo e negativo, acoplados a uma fonte de energia (fonte de eletroforese), onde são controladas a voltagem e a intensidade de corrente elétrica. No campo elétrico estabelecido no gel, as moléculas com cargas positivas migram para o polo negativo (cátodo) e as moléculas com carga negativas migram para o polo positivo (ânodo).

Numa eletroforese em gel de poliacrilamida, por exemplo, é possível igualar a carga de todas as proteínas das amostras, pela adição de um detergente biológico referido como dodecil sulfato de sódio (SDS), que confere cargas negativas a todas as moléculas e, conseqüentemente, essas serão separadas de acordo com seus diferentes pesos moleculares. Após a eletroforese, o uso de soluções químicas, que funcionem como corantes (*Coomassie Blue* ou Nitrato de Prata, por exemplo), permitem a detecção de faixas, também conhecidas como 'bandas', no gel, indicativas da presença das frações proteicas. E, quando marcadores de pesos moleculares conhecidos, adquiridos no mercado de reagentes químicos, são usados na eletroforese, é possível caracterizar as várias frações, ou 'bandas', de acordo com o peso molecular de cada uma. Esse sistema de eletroforese ficou conhecido como eletroforese em gel de poliacrilamida e SDS, cuja sigla é SDS-PAGE.

Quando a eletroforese é aliada a procedimento de coloração específicos, como a utilização de substratos específicos associados a corantes nas misturas de reações empregadas para visualizar o fracionamento das moléculas (soluções de coloração), o conjunto desses procedimentos permite a análise de enzimas específicas, ou isozimas. Os substratos específicos para as enzimas de interesse, misturados com corantes e co-fatores, quando em contato com o gel e devidamente incubados, revelam regiões coradas indicativas dos locais onde se processou uma reação específica. A combinação desses protocolos específicos foi desenvolvida por Hunter e Markert (1957) e

tem garantido a caracterização dos produtos gênicos, interpretados como fenótipos eletroforéticos ou zimogramas.

### **1.11. Interpretação dos fenótipos eletroforéticos de proteínas solúveis totais**

Na eletroforese para analisar proteínas solúveis totais, as 'bandas' correspondentes a essas moléculas são separadas e caracterizadas em razão de seus pesos moleculares e/ou pontos isoelétricos, concluídos a partir do emprego dos marcadores de pesos moleculares conhecidos. As frações proteicas das amostras, com seus respectivos pesos moleculares estimados, são comparados numa eletroforese em SDS-PAGE, computando-se a presença ou ausência, ou diferentes intensidades de coloração das frações proteicas.

Como produtos primários do genes, os padrões ou fenótipos polipeptídicos dos organismos devem, portanto, refletir a atividade dos genomas nos diversos organismos, tecidos, grupos de células, ou mesmo em estágios diferentes do desenvolvimento ou quando submetidos a diferentes condições ambientais.

#### **1.11.1. Interpretação dos fenótipos eletroforéticos de isoenzimas**

Para esclarecer a interpretação de zimogramas ou de fenótipos eletroforéticos isoenzimáticos, é necessário que os fatores envolvidos com a formação das isoenzimas sejam considerados detalhadamente. Tal fenótipo é interpretado, e seu genótipo é deduzido. A população de indivíduos é então analisada em termos de locos, e respectivos alelos, para cada sistema isoenzimático.

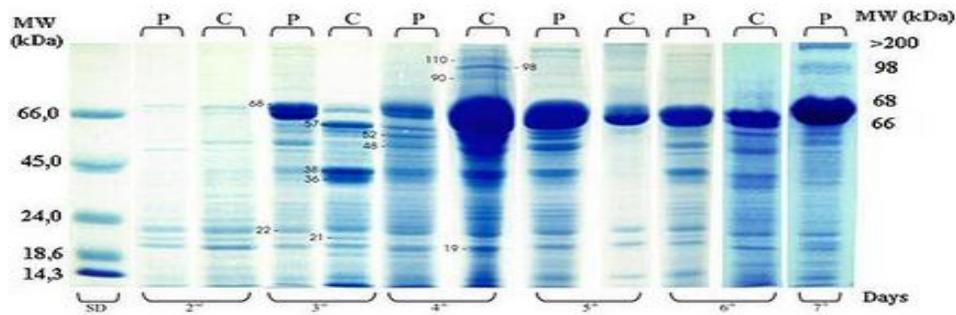
Nas enzimas monoméricas, o padrão de bandas de um heterozigoto é uma mistura das duas formas que ocorrem em cada um dos homozigotos correspondentes. Nas enzimas multiméricas, isto é, compostas por mais de um peptídeo, são formadas enzimas heteroméricas nos heterozigotos, bem como são observadas formas homoméricas nos homozigotos correspondentes. Isso

ocorre porque, após a tradução, peptídeos se combinam dando origem a moléculas multiméricas.

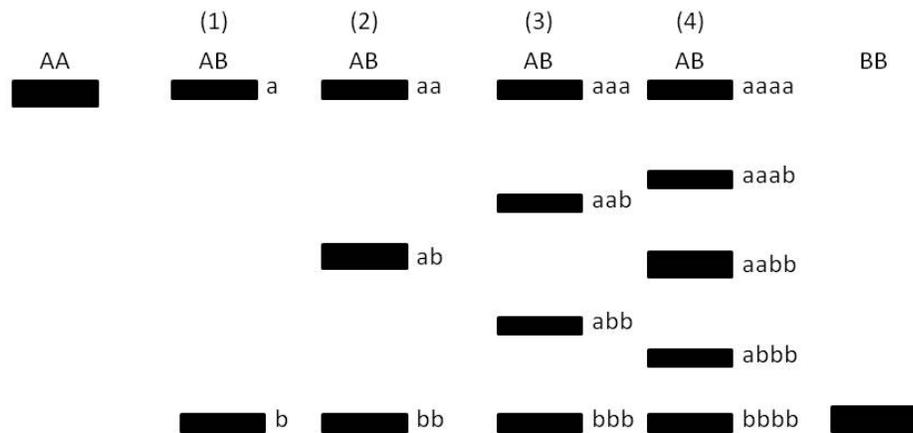
No geral, se o número de subunidades presentes na aloenzima sintetizada no homocigoto for  $n$ , são esperadas  $n+1$  aloenzimas nos heterocigotos. Assim, os heterocigotos para enzimas monoméricas apresentam duas bandas e para as diméricas, três bandas. Quando a enzima é composta por quatro peptídeos (tetramérica), são visualizados cinco bandas no gel de um indivíduo heterocigoto e as bandas dos extremos representam as formas homoméricas. Em qualquer um dos sistemas, os homocigotos apresentam somente uma banda, que resulta da expressão da única forma alélica para aquele loco gênico.

Padrões mais complexos podem ser observados quando há associação de cadeias peptídicas codificadas por locos gênicos distintos (sistemas multigênicos). Nesse caso, além das aloenzimas formadas pela interação entre peptídeos derivados de alelos de um mesmo loco, há também enzimas formadas pela interação entre peptídeos oriundos de alelos pertencentes a locos diferentes (intergênicas).

Alelos nulos ou silenciosos também podem levar a interpretações errôneas dos géis. Nesse caso, não é produzida nenhuma proteína ativa. Outras situações complexas envolvem a comigração de peptídeos, presença de bandas adicionais oriundas de modificações pós-traducionais e artefatos introduzidos no decorrer da técnica. Esses fatores, aliados ao número reduzido de locos detectados, contribuem para a limitação do uso da técnica quando se pretende obter uma cobertura mais ampla do genoma.



**Figura 14:** Padrão eletroforético (SDS-PAGE) de *Ascia monuste* em terceiro instar, hemolinfa do controle (C) e parasitada por *Cotesia glomerata* (P):



**Figura 15:** Fenótipo eletroforético de isoenzimas. (1) enzima monomérica, (2) dimérica, (3) trimérica, e (4) tetramérica em relação a genótipos observados no loco isoenzimático.

## 2. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AESCHLIMANN, J. A.; REINERT, M. Acetylcholinesterase and anticholinesterases, em: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. (G. A. Kerkut, e L. I. Gilbert, eds.), Pergamon Press, p. 115-130, 1931.

ALDRIDGE, W. N. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.*, v. 53, p. 110-117, 1953.

APPERSON, C. S.; GEORGHIOU, G. P. Mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides in *Culex tarsalis*. *J. Econ. Entomol.*, v. 68, n. 2, p. 153-157, 1975.

BECKER, N. et al. *Mosquitoes and their control*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 377p., 2003.

- CASIDA, J. E. Pyrethrum flowers and pyrethroid insecticides. *Environ. Health Persp.*, v. 34, p. 189-202, 1980.
- COLLINS, F.H. et al. Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, v. 11, p. 409-418, 2002.
- CREMLYN, R. *Pesticides. Preparation and mode of action*. John Wiley e Sons, New York, 240 p., 1978.
- CROFT, B. A. Developing a philosophy and program of pesticide resistance management. Em: B. E. Tabashnik and R. T. Roush, editors, *Pesticide Resistance in Arthropods*. New York: Chapman and Hall. p. 277-296, 1990.
- CROW, J. F. Genetics of resistance to chemicals. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 2, p. 227-246, 1957.
- DENHOLM, I.; ROLLAND, M. W. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 37, p. 91-112, 1992.
- ELDEFRAWI, A. T. Acetylcholinesterase and anticholinesterases, em: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. (G. A. Kerkut, e L. I. Gilbert, eds.), v. 12, Pergamon Press, p. 115-131, 1985.
- FEYEREINSEN, R. Insect P450 enzymes. *Ann. Rev. Entomol.*, v. 44, p. 507-533, 1999.
- FERRARI, J. A.. Population genetics in vector biology. Em: Marquardt W. C. & Beaty B. J. *The Biology of Disease Vectors*. University Press of Colorado, Niwot, p. 512-525, 1996.
- FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. Isoenzimas: Base genética dos marcadores isoenzimáticos. In: FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-cenargem, 1998. Cap. 2. p. 18-19.
- GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in arthropods. Em: G. P. Georgiou and T. Saito, editors. *Pest Resistance to Pesticides*. New York, Plenum, p. 769-792, 1983.
- GEORGHIOU, G. P.; LAGUNES-TEJEDA, A.; BAKER, J. D. Effect of insecticide rotations on evolution of resistance, em: *5th Int. Congr. Pestic. Chem. (IUPAC), Kyoto*. (J. Miyamoto, e P. C. Kearney, eds.), Pergamon Press, Oxford, UK, p. 183-189, 1983.
- HAWKES, N. J.; HEMINGWAY, J. Analysis of the promoters for the  $\beta$ -esterase genes associated with insecticide resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Acta*, v. 1574, p. 51-62, 2002.
- HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 45, p. 371-391, 2000.

HEMINGWAY, J. et al. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 34, p. 653-665, 2004.

HILL, D. S.; WALLER, J. M. Pests and diseases of tropical crops, em: *Principles and methods of control*. Longman, London and New York, 1982.

KARUNARATNE, S. H. P. P. et al. Amplification of a serine esterase gene is involved in insecticide resistance in Sri Lanka *Culex tritaeniorhynchus*. *Insect Mol. Biol.*, v. 7, p. 307-315, 1998.

LOECK, A. E. *Praga de Produtos Armazenados*. Pelotas, RS, EGUFPEL, 113p., 2002.

LORINI, I. *Manejo Integrado de Pragas de Grãos de Cereais Armazenados*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2008. 72p.

LORINI, I.; SCHNEIDER, S. *Pragas de Grãos Armazenados: resultados de pesquisa*. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1994. 47p.

MADDRELL, S. H. P. The insect neuroendocrine system as a target for insecticides, em: *Insect neurobiology and pesticide action*. Society of Chemical Industry, London, p. 329-334, 1980.

MATHENGUE, E. M. et al. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Western Kenya. *J. Med. Entomol.*, v. 38, n. 4, p. 531-536, 2001.

MACHADO, M. F. P. S; COLLET, S. A. O; MANGOLIN, C. A. **Expressão Gênica no Desenvolvimento de Tecidos vegetais "in vitro"**. Maringá: Eduem, 1999. 98 p.

MULLA, M. S.; DARWAZEH, H. A.; ZGOMBA, M. Effect of some environmental factors on the efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against mosquitoes. *Bull. Soc. Vector Ecol.*, v. 15, p. 166-175, 1990.

PAIVA, M.H.S. Monitoramento do gene, que codifica a esterase, envolvida na resistência a inseticidas organofosforados em populações naturais de *Aedes aegypti* do Brasil. Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Brasil, 2006.

PINTO, L. R. et al. Isoenzimas e Microssatélites em Plantas: Aspectos técnicos e interpretação genética. *Biotechnologia cienc. desenvolv.*, v. 3, n. 20, p.16-19, jun. 2001.

RANSON et al. Molecular analysis of multiple cytochrome P450 genes from the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, v. 11, n. 5, p. 409-418, 2002.

RANSON, H., HEMINGWAY, J. *glutathione S-transferases*, em: *Insect pharmacology and control*, Glibert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. (Eds.). Elsevier Ltd, Oxford, UK, 2004.

RAYMOND, M. et al. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philos. Trans. R. Soc. London*, v. 353, p. 1707-1711, 1998.

RETNAKARAN, A. et al. Insect Growth Regulator, em: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. (G. A. Kerkut, e L. I. Gilbert, eds.), v.12, Pergamon Press, p. 529-601, 1985.

RICHARDS, S. et al. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, v. 452, n. 7190, p.957-955, abr. 2008.

RUIGT, G. S. Pyrethroids, em: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. (G. A. Kerkut, e L. I. Gilbert, eds.), v. 12, Pergamon Press, p.183- 263, 1985.

SALINAS, A. E.; WONG, M. G. Glutathione S-transferases – A review. *Current Med.Chem.*, v. 6, p. 279-309, 1999.

SAWICKI, R. Definition, detection and documentation of insecticide resistance. In: FORD, M. G., HOLLOMAN, D. W., KHAMBAY, B. P. S. e SAWICKI, R. M. (eds.), *Combating resistance to xenobiotics*. Ellis Horwood, Chichester, England, p. 105-107, 1987.

SCAGLIA, M. et al. Haemolymph electrophoretic pattern of *Ascia monusteorseis* larvae (Lepidoptera: pieridae) parasitized by *Cotesia glomerata* (Hymenoptera: braconidae). *J Venom Anim Toxins* v. 9, n. 1, p.89-103, jul. 2003.

SODERLUND, D. M.; KNIPPLE, D. C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 33, p. 563-577, 2003.

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

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents, em: *The pharmacological basis of therapeutics* (A.G. Gilman, L. S. Goodman, and A. Gilman, eds.), 6th edition, Macmillan, New York, p. 100-119, 1980.

TIJET, N.; HELVIG, C.; FEYEREISEN, R. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, v. 262, p. 189-198, 2001.

WILCE, M. C.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S transferases. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1205, p. 1-18, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATIONS (WHO) 2005. The WHO recommended classification of pesticides by hazard. Disponível em: [www.who.org/tdr](http://www.who.org/tdr). Acesso em: 30/01/2006.

ZAIM, M.; GUILLET, P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasit.*, v.18, n. 4, p. 161-163, 2002.

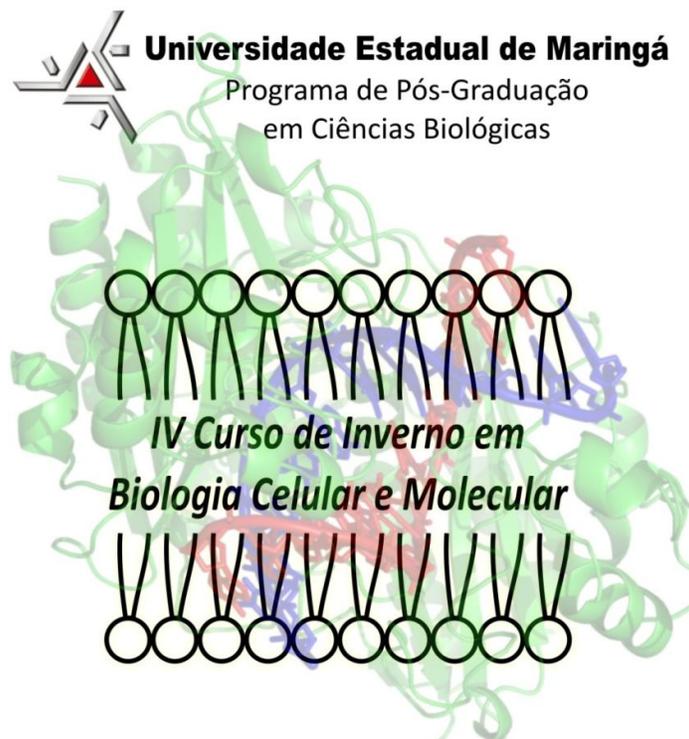
# MINICURSO 6

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS SINTÉTICOS



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*15 a 18 de Julho de 2014*

**LABORATÓRIO DE DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NO  
DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS E COSMÉTICOS**

**Professor:**

Celso Vataru Nakamura

**Pós-graduandos:**

**Angelo de Oliveira Caleare**

**Francielle Pelegrin Garcia**

**Franciele Peron**

**Hélito Volpato**

**Jessica Carreira de Paula**

**Solange Cardoso Martins**

**Talitha Fernandes Stefanello**

## 1. 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*) e protozoários (*Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*). O presente minicurso se propõe a apresentar algumas 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 mucocutânea (CROFT & COOMBS, 2003; GENARO & REIS, 2005; NGURE et al., 2009). A leishmaniose visceral (LV), também 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 a 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 *Lutzomya* 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, abrigando-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 & 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, 2005).

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, 2005; 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).

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 desenvolvidos (BERMAN, 1996; GREVELINK & LERNER, 1996; BERMAN, 1997).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Proporcionar aos alunos conhecimentos sobre técnicas básicas utilizadas para investigar a atividade biológica de novas substâncias naturais e sintéticas contra *Leishmania amazonensis*, bem como elucidar seus mecanismos de ação.

### **2.2. Específicos**

- Verificar uma possível atividade antileishmania do composto sobre a forma promastigota de *L. amazonensis*;
- Verificar a citotoxicidade do composto em linhagem de macrófagos murinos J774A1;
- Obter indícios sobre o mecanismo de ação do composto em formas promastigotas de *L. amazonensis*, através de técnicas de fluorimetria e microscopia de fluorescência

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. 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 mantidas a 25 °C. Macrófagos J774A1 serão cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma, St Louis, MO, USA), pH 7.6, suplementado com 10% de SFB e mantidos a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.2. Ensaio antiproliferativo**

O ensaio antiproliferativo é o experimento inicial na busca de substâncias com atividade antileishmania. O experimento busca determinar a concentração da substância na qual ocorra a inibição de 50% dos

protozoários após 72 h de tratamento, quando comparado a um grupo controle, sendo esta concentração denominada de IC<sub>50</sub>.

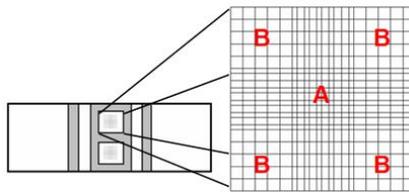
### 3.3. Pesagem e diluição das drogas

- Pesar a droga utilizando microtubosestéreis (**1 mg** para **compostos sintéticos** e 10 mg para extratos e frações);
- Adicionar 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) ao microtubo, agitar até completa diluição da droga e completar com 900 µL de meio Warren (solução estoque: 1000 µg/mL);
- Identificar 4 microtubos estéreis (Concentrações: **500, 100, 50 e 10 µg/mL**) para realizar a diluição da droga;
- Adicionar aos microtubos identificados, respectivamente, 500, 800, 500 e 800 µL de Warren;
- Homogeneizar e transferir 500 µL da solução estoque para o microtubo 1 (C: 500 µg/mL);
- Homogeneizar o microtubo 1 e transferir 200 µL deste para o microtubo 2 (C: 100 µg/mL);
- Homogeneizar o microtubo 2 e transferir 500 µL deste para o microtubo 3 (C: 50 µg/mL);
- Homogeneizar o microtubo 3 e transferir 200 µL deste para o microtubo 4 (C: 10 µg/mL).

### 3.4. Padronização do inóculo

- Formas promastigotas de *L. amazonensis* serão previamente cultivadas 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 de inóculo 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  $1 \times 10^6$  parasitos/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  $1 \times 10^6$  parasitos/mL;
- Como o experimento em geral é montado simultaneamente para duas drogas em uma placa de 24 poços, é preciso padronizar o volume real (VR) de inóculo a ser coletado para 25 mL (volume **V** x 25 = VR).

### 3.5. 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.

### 3.6. Montagem e Leitura do experimento

- Transferir 100  $\mu$ L de cada eppendorf contendo as drogas para dois poços (ensaio em duplicata) da placa, para os poços controle transferir 100  $\mu$ L de Warren;

- Adicionar 900  $\mu\text{L}$  do pool a cada poço, obtendo-se uma concentração final 10 vezes menor que a obtida no eppendorf (100, 50, 10, 5 e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );
- Homogeneizar a placa e incubar a 25  $^{\circ}\text{C}$  por 72 h;
- Após o tempo de ensaio realizar a contagem de parasitos em câmara de Neubauer.

### **3.7. Ensaio de citotoxicidade**

O Ensaio de citotoxicidade é uma metodologia de ampla utilização que permite verificar o quão tóxica é uma substância para determinada célula. Em nosso caso usaremos células da linhagem J774A1 (macrófagos) como modelo.

### **3.8. Obtenção da monocamada de células**

- Usar garrafas de cultura pequena com tapete de células fechado como fonte de inóculo;
- Retirar o meio de cultura (RPMI) das garrafas e lavar o tapete de células com PBS;
- Com auxílio de um “cell scraper” (rodinho), realizar a remoção das células da superfície da garrafa;
- Adicionar meio de cultura e reservar em gelo;
- Transferir 50  $\mu\text{L}$  desta suspensão para um eppendorf contendo 450  $\mu\text{L}$  de meio;
- Homogeneizar o conteúdo do eppendorf e proceder a contagem em Câmara de Neubauer (Fig 1), contando apenas as células presentes nos quatro quadrantes laterais (regiões B) de cada campo, dividindo o número total contado por quatro obtendo uma média;
- Multiplicar a média pelo fator de correção da câmara ( $10^4$ ) e pela diluição (10);

- Proceder os cálculos tal como no ensaio antiproliferativo, sabendo que para o experimento de citotoxicidade é ideal um inóculo de  $5 \times 10^5$  células;
- Preparar o pool contendo o volume de inóculo calculado, 10% de SFB, meio de cultura em q.s.p. 10 mL;
- Distribuir 100  $\mu$ L 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<sub>2</sub> por 24 h.

### **3.9. Tratamento das células**

- Pesar e diluir as drogas em DMSO tal como no ensaio antiproliferativo;
- Preparar as diluições em eppendorf, utilizando meio de cultura RPMI, visando obter concentrações finais de 500, 100, 50, 10 e 1  $\mu$ g/mL;
- Após a formação da monocamada de células, retirar o meio de cultura dos poços e transferir 100  $\mu$ L 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<sub>2</sub> por 48 h.

### **3.10. Leitura do experimento**

- Após o período incubação, retirar o meio de cultura, lavar cada poço com 100  $\mu$ L de PBS, retirar o PBS e adicionar 50  $\mu$ L de MTT;
- Incubar na estufa por 4 h;
- Após incubação, retirar o MTT e adicionar 150  $\mu$ L de DMSO;
- Realizar a leitura em Leitor de ELISA a 492 nm.

### **3.11. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio por H<sub>2</sub>DCFDA**

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são compostos químicos resultantes da ativação ou redução do oxigênio molecular. Um dos principais locais da produção de EROs são as mitocôndrias durante os processos de respiração celular. Dentre as espécies mais comuns, pode-se citar: superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ). As EROs são moléculas altamente oxidantes, capazes de causar danos aos constituintes celulares, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos.

O marcador diacetato de 2',7'-dihidro dicloro fluoresceína ( $H_2DCFDA$ ) é altamente utilizado como indicador de EROs, detectando principalmente  $OH^{\bullet}$  e  $H_2O_2$ . O marcador permeia as células onde é desacetilado por esterases intracelulares, levando a sua retenção dentro das células. Após sua oxidação por EROs, a molécula não fluorescente  $H_2DCFDA$  é convertida na altamente fluorescente 2',7'-dicloro fluoresceína (DCF), a qual pode ser detectada por fluorimetria, entre outras técnicas capazes de avaliar fluorescência.

#### **3.11.1. Técnica**

- Após tratamento com a substância por 24 h, lavar 2x as células com PBS (3000 rpm; 5 min.);
- Ressuspender o “pellet” em 497,5  $\mu$ L de PBS e adicionar 2,5  $\mu$ L de  $H_2DCFDA$  (5  $\mu$ g/mL);
- Incubar a 25 °C por 45 minutos ao abrigo da luz;
- Transferir 100  $\mu$ L da amostra (em triplicata) para placa de 96 poços preta e realizar em fluorímetro.

### **3.12. Avaliação do acúmulo de inclusões lipídicas por Vermelho do Nilo**

A formação de inclusões lipídicas é um processo celular normal das células eucarióticas, inclusive protozoários. Estas inclusões de aspecto

circular podem apresentar tamanhos variados e estarem distribuídas por todo o citoplasma da célula. A formação regulada de corpos lipídicos atua na sinalização e ativação celular, regulação do metabolismo de lipídios, tráfego da membrana celular e controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios (MOLINARO, 2010). Contudo, a presença de um número elevado destas inclusões pode ser um indicativo de alteração na síntese, utilização ou degradação de lipídios pela célula. O Vermelho do Nilo é um marcador altamente fluorescente capaz de evidenciar lipídios de forma específica e sensível, sem causar a sua remoção da célula (SOUZA, 2010).

### 3.12.1. Técnica

- 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 Vermelho do Nilo (10 µg/mL);
- Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo a luz;
- Transferir 100 µL da amostra (em triplicata) para placa de 96 poços preta e realizar em fluorímetro;
  - Analisar as amostras em microscópio de fluorescência.

## 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

Berman, J. D. Human Leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

Berman, J. D. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 14, n. 5, p. 519-522, 1996.

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.

Cavalcanti, D. P.; Thiry, M.; De Souza, W.; Motta, M. C. M. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. **Histochemistry Cell Biology**, v. 130, p. 1177-1185, 2008.

Croft, S. L. Recent developments in the chemotherapy of leishmaniasis. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 9, n. 10, p. 376-381, 1988.

Croft, S. L.; Coombs, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

De Carvalho, P. B.; Ferreira, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, v. 72, n. 6, p. 599-618, 2001.

Genaro, O.; Reis, A. B. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves, D. P. Parasitologia humana. 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 47-64, 2005.

Grevelink, S. A.; Lerner, E. A. Leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**. St. Louis, v. 34, n. 2, p. 257-272, 1996.

<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/index.htm> (**FIOCRUZ**).

<http://www.portalsaude.saude.gov.br> (**POSTAL DA SAÚDE**).

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution In The Leishmaniasis in Biology and Medicine, **Academic Press**, London, v. 1, p. 1-120, 1987.

Michalick, M. S. M.; Genaro, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: Neves, D. P. Parasitologia humana. 11o ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 47-64.

Molinari, E. M. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2 / Organização de Etelcia Moraes Molinari, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Reis Amendoeira – Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2010.

Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G. Advances in Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

Ngure, P. K.; Kimutai, A.; Ng'ang', Z. W.; Rukunga, G.; Tonui, W. K. A review of Leishmaniasis in Eastern Africa. **Journal of Nanjing Medical University**, v. 23, n. 2, p. 79-86, 2009.

Opperdoes, F. R.; Coombs, G. H. Metabolism of Leishmania: proven and predicted. **Trends in Parasitology**, v. 23, p. 149-158, 2007.

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

Souza, C. S. F.; Maia, H.; Calabrese, K. S.; Rosa, M. S. S.; Cupolilo, S. M. N.; Da Costa, S. C. G.; Do Valle, T. Z. As Leishmanioses. Departamento de protozoologia. Fundação Osvaldo Cruz, 1997.

Souza, W. Microscopia Óptica: fundamentos e aplicações às Ciências Biomédicas. **Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise**, ed Artes Gráficas Ltda, 2010.

Vannier-Santos, M. A.; Martiny, A.; De Souza, W. Cell Biology of Leishmania spp.: Invading and Evading. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 297–318, 2002.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis: geographical distribution. In: WHO, Communicable Diseases Surveillance and Response, Geneva: WHO, 2001a. Disponível em <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>>.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis: the disease and its impact. In: WHO, Communicable Diseases Surveillance and Response, Geneva: WHO, 2001b. Disponível em <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisdis1.html>>.

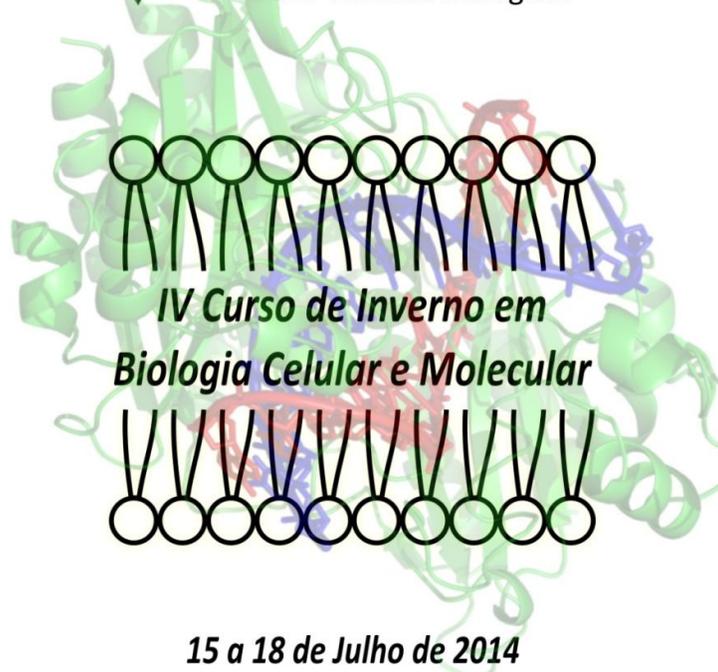
# MINICURSO 7

## MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DO SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*

*15 a 18 de Julho de 2014*

**LABORATÓRIO DE HISTOTECNICA ANIMAL**

**Professores:**

Maria Raquel Marçal Natali

Nilza Cristina Buttow

**Pós-graduandos:**

Evandro José Beraldi

Fernando Augusto Vicentini

Jean Carlos Fernando Beson

Larissa Carla Lauer Schneider

Lia Mara Teobaldo Tironi

## **2. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Trato gastrointestinal 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 túnicas são semelhantes em toda extensão do trato gastrointestinal, entretanto apresentam algumas modificações e especializações regionais:

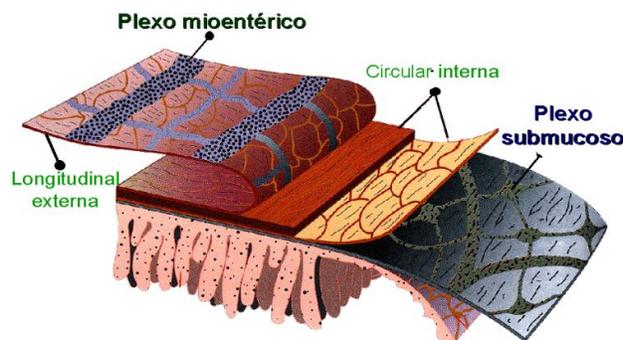
- Mucosa: Composta por um revestimento epitelial, abaixo do qual há um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos, denominado lâmina própria e uma camada muscular que a envolve, denominada muscular da mucosa (Gartner e Hiatt, 2003; Junqueira e Carneiro, 2011);
- Submucosa: Camada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

- 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)



**Figura. 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).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **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  $\beta$ -citotóxicos como a aloxana e a estreptozotocina (Reis e Alcolado, 2005) que consiste numa maneira eficiente para promover o diabetes tipo I e assim, torna-se possível o estudo de mecanismos fisiopatológicos, atividade hipoglicemiante e anti-diabetogênica de certos compostos. A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico, de natureza glicosamina-nitrosuréia, com propriedades tóxicas, isolada de *Streptomyces achromogenes* e é captada pelas células  $\beta$ -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  $\beta$ -pancreáticas, Bolzán e Bianchi (2002) relataram que a STZ interfere no metabolismo energético das células  $\beta$ -pancreáticas, comprometendo a biossíntese de insulina e resultando em apoptose celular.

Em nosso laboratório, para o estabelecimento do modelo animal de diabetes mellitus realizamos uma injeção endovenosa (veia peniana) de STZ dissolvida em tampão citrato 10 mmol/L (pH 4,5), em ratos submetidos a um jejum prévio de quatorze horas, na dosagem de 35 mg/kg de peso corporal. Posteriormente, os animais são mantidos em jejum por duas horas para que não haja competição da STZ com a glicose circulante pelas células  $\beta$ -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 pode ser realizado o método da glicose oxidase (Bergmeyer e Bernet, 1974), sendo considerados diabéticos todos os ratos que apresentarem glicemia acima de 210 mg/dl. Além disso, mantendo os animais em gaiolas metabólicas individuais, é possível acompanhar o estabelecimento da doença

medindo além da glicose, sintomas típicos do diabetes mellitus, tais como: poliúria (aumento da excreção de urina), polidipsia (aumento da ingestão de água) e polifagia (aumento da ingestão de ração).

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

## **2.2. Doenças inflamatórias intestinais**

As doenças inflamatórias intestinais (DII) incluem duas formas principais, a colite ulcerativa e a doença de Crohn. Embora ambas sejam patologias distintas, elas apresentam algumas características em comum, como a origem idiopática, os cursos alternados de remissão e ativação da inflamação, e as manifestações clínicas, como dores abdominais, diarreia severa, sangramento retal, febre, perda de peso e possíveis complicações sistêmicas.

A colite ulcerativa é a forma de DII mais branda, porém não menos prejudicial. Ela afeta apenas a mucosa do intestino grosso, podendo se estender até o reto. Está relacionada com uma inflamação mediada por células auxiliares do tipo 2 (Th2), que liberam IL-4, IL-5 e IL-13. Em alguns casos de colite ulcerativa o tratamento pode ser realizado por remoção cirúrgica do colo. Já a doença de Crohn pode atingir desde a porção final do íleo até o intestino grosso. É caracterizada por processos inflamatórios crônicos, com lesões transmuralis, ou seja, que afetam todas as camadas da parede do órgão. As lesões também são bem demarcadas, e são intercaladas por regiões do segmento sem inflamação. Neste caso pode haver formação de granulomas (acúmulo de linfócitos na parede intestinal), oclusão do lúmen intestinal por fibrose, formação de fístulas (regiões do intestino ligadas a outros órgãos) e perfurações intestinais. As principais células associadas a este tipo de DII são as células auxiliares tipo 1 (Th1), que produzem TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , IL-12, entre outras citocinas.

Além de prejudicar a morfologia e a fisiologia da parede intestinal, as DIIs também afetam o SNE, alterando a arquitetura padrão dos plexos,

gerando trocas nos conteúdos dos neuropeptídeos e levando, por fim, a morte de parcela da população neuronal. Esta morte dos neurônios entéricos está associada aos processos que ocorrem no início da inflamação, uma vez que foi relatada a presença de neutrófilos e eosinófilos adjacentes aos gânglios submucoso e mioentérico.

Existem algumas teorias que tentam explicar a origem destas DIIs, mas particularmente, uma delas é a mais estudada e mais aceita. Esta teoria discorre sobre a relação das bactérias comensais da flora intestinal com o sistema imune da mucosa. Resumidamente, o problema estaria na regulação das células T do sistema imune, o qual, devido a algum defeito, não reconhecem as bactérias naturais da flora, reagindo contra estas, desencadeando reações inflamatórias. Os pesquisadores estão buscando a origem destes defeitos em fatores genéticos, porém esta tarefa é um pouco complexa. Entretanto cientistas descrevem a associação de defeitos no gene CARD15, que codifica proteínas relacionadas com a identificação das bactérias comensais, com o desenvolvimento de DII. E ainda não descartam a influência dos fatores ambientais para a quebra desta homeostasia da mucosa intestinal, como os principais fatores desencadeantes os hábitos de fumar, de usar antibióticos e drogas anti-inflamatórias não esteroidais, o estresse e uma alimentação rica em aditivos.

Para o estudo das DIIs foram desenvolvidos numerosos modelos em animais que simulam a inflamação no trato digestório. Destacam-se os modelos que utilizam manipulação genética, como camundongos que possuem deleção de IL-2 e IL-7, além de modelos que induzem a colite com compostos químicos. Os compostos são dos mais variados tipos, como exemplo o ácido acético, iodoacetamina, dextran sulfato de sódio (DSS), e o utilizado em nosso laboratório, a indução com ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS).

O modelo de estudo de colite causada por TNBS se baseia no fato de que, com um aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, ocasionado pelo etanol, utilizado como solvente do ácido, permite-se a entrada do TNBS, um hapteno, o qual se associa com substâncias de alto peso molecular, como as proteínas teciduais da lâmina própria, e então desencadeia uma resposta

inflamatória. Este processo inflamatório gera características semelhantes à doença de Crohn.

### **2.3. Restrição alimentar**

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

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

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

A restrição calórica é definida como a dieta em que a quantidade diária de alimento ingerido é menor do que a que o animal seria capaz de ingerir até ficar completamente saciado. A restrição pode ser feita tanto controlando a quantidade de alimento fornecido, quanto através da manipulação dos componentes da dieta. As pesquisas conduzidas com restrição calórica têm

utilizado diminuição da quantidade de alimento sem manipulação da quantidade e qualidade calórica das dietas. Entretanto, a restrição dietária não deve vir acompanhada de nenhum grau de desnutrição (Masoro et al., 1992), assim como, se a dieta for manipulada deve manter os componentes nutricionais necessários para manutenção do animal (Weihe, 1987).

#### **2.4. Dietas hipercalóricas e obesidade**

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

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

#### **2.5. Isquemia/Reperusão mesentérica**

A isquemia ocorre quando um órgão não é suprido em quantidade suficiente de sangue, como resultado de choque, doença vascular ou

transplante de órgãos. Os danos causados pelo processo de isquemia e 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 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, 2009) em condições clínicas como transplantes, cirurgias e diversos estados patológicos (Rivera et al., 2009). Curtos períodos de isquemia mesentérica resultam em aumento da permeabilidade microvascular, enquanto uma isquemia prolongada pode resultar em ruptura da barreira mucosa intestinal através principalmente de metabólitos de oxigênio reativo (Berland e Oldenburg, 2008) como radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila e neutrófilos polinucleares (Berland e Oldenburg, 2008; Sehirlı et al., 2009).

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

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

Em estudos de lesão mesentérica por I/R foram detectadas alterações na forma neural, no arranjo dos neurônios, na intensidade de coloração do plexo mioentérico (Bolekova et al., 2011), alteração de suas propriedades e até mesmo causa sua morte (Sehirli et al., 2009; 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).



## 2.6. Envelhecimento

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

2003) e organização dos plexos, podendo levar a sintomas como redução do tempo de esvaziamento gástrico e dos movimentos peristálticos, atividades moduladas pela inervação intrínseca do trato gastrointestinal (Wade & Cowen, 2004).

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

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

## **2.7. 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<sub>2</sub><sup>-</sup>), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o óxido nítrico (NO) são três espécies reativas ao oxigênio que são essenciais para a fisiologia normal, mas que acredita-se que possam acelerar o processo de envelhecimento e mediar a degeneração celular em estados patológicos (Vincent et al., 2004).

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

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

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

## **2.8. Métodos Histoquímicos**

### **2.8.1. 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.

### **2.8.2. 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 acceptor 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.

### **2.8.3. NADPH-diaforase**

Esta técnica baseia-se na atividade da enzima óxido nítrico sintetase neuronal, uma enzima que produz o neurotransmissor óxido nítrico à partir do aminoácido arginina. O óxido nítrico é um importante neurotransmissor inibitório no sistema nervoso entérico. Essa técnica permite o estudo da subpopulação de neurônios nitrérgicos entéricos. Para a marcação neuronal segmentos do trato gastrointestinal são incubados em um meio contendo um acceptor 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.

## **2.9. Métodos Imunohistoquímicos**

Métodos de coloração imunohistoquímica são amplamente utilizados atualmente. O reagente pivô, comum a todas as técnicas imunohistoquímicas é o anticorpo. Soluções contendo anticorpos (antisoros) específicos para um grande número de antígenos teciduais têm expandido a quantidade e qualidade do repertório imunohistológico. 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. Soluções de anticorpos utilizadas em colorações imunohistoquímicas contém principalmente anticorpos da classe IgG, com menores quantidades das demais classes. Os anticorpos ligam-se a um segundo tipo de marcador, que pode ser fluorescente (fluoresceína, rodamina) ou uma enzima (fosfatase alcalina e peroxidase).

### **2.9.1. Coleta de Material**

Retirar o segmento de interesse

Lavagem do segmento – PBS

Fixação: Paraformaldeído - 3 hs, temperatura ambiente

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

Manter o material no PBS com azida sódica 0,08% para posterior dissecação.

### **2.9.2. Dissecação**

Após a dissecação, manter as membranas em PBS com azida. Realizar a primeira lavagem (2x 500 uL por 5 min) em PBS + Triton 0,5% (PBS+T)

- *Bloqueio*

Uma hora, temperatura ambiente.

Solução: PBS+T + soro de cabra 10% + BSA 0,2%

- *Anticorpo Primário:*

Incubar em anticorpo primário por 48 h.

Solução: PBS+T + soro de cabra 2% + BSA 0,2% + anticorpo 1<sup>o</sup>

### **2.9.3. Anticorpo Secundário:**

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

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

Solução: PBS+T + soro de cabra 2% + BSA 0,2% + anticorpo 2<sup>o</sup>

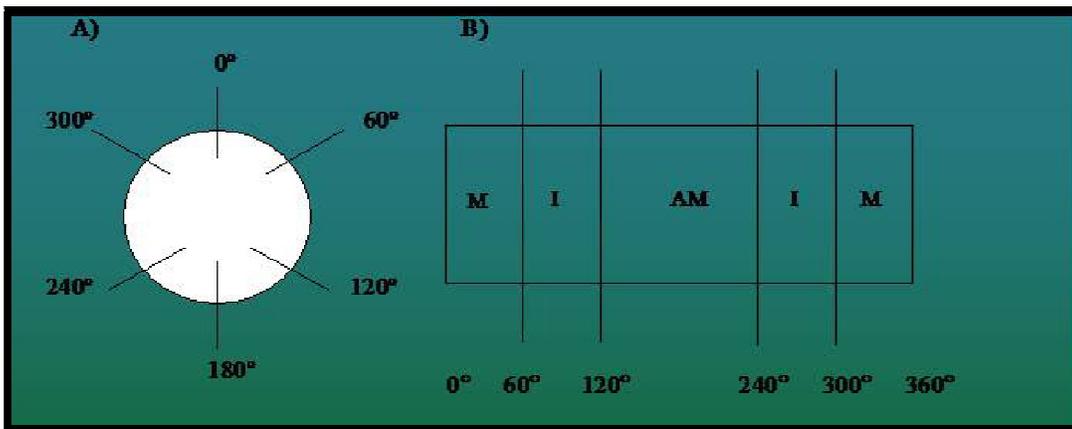
### **2.9.4. Montagem das lâminas:**

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

## **2.10. 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 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 retroprojektor.



**Figura 2.** Divisão didática da circunferência intestinal.

A quantificação neuronal por densidade se baseia na contagem ou captura de imagens em campos aleatórios dentro da região (ou regiões) escolhida para estudo. Quando a objetiva utilizada para análise é de 20X, utiliza-se 32 campos microscópicos, geralmente em capturas de imagens nas lâminas de imunofluorescência. Para a contagem direta no microscópio utiliza-se objetiva de 40X e 80 campos microscópicos (este número pode variar dependendo da pesquisa que está sendo realizada). Pode-se realizar a análise em apenas uma região (I ou AM), ou dividir a quantidade de imagens abrangendo ambas regiões, o importante é seguir um padrão para todos os animais. A região mesentérica (M) é pouco utilizada por sofrer injúrias durante o processamento, tornando a visualização celular mais complexa. Após a captura das imagens realiza-se a contagem de todos os neurônios, obtendo-se uma soma que, juntamente com a soma da área analisada, será convertida em neurônios/cm<sup>2</sup>, neurônios/mm<sup>2</sup> ou neurônios/área total analisada.

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

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

### **2.10.1. Análises estatísticas**

Os dados devem ser analisados quanto à sua distribuição (normalidade) através do teste Kolmogorov-Smirnov (KS). Dados paramétricos são submetidos à Análise de Variância (*one-way* ANOVA) e o pós teste de Tukey com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism<sup>®</sup> 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.

### **3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

IMAI, H; NAGAKAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical*

*Biology and Medicine*, 34: 145-169, 2003.

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

JUNQUEIRA, LCU; CARNEIRO, JC. *Histologia Básica*, 11<sup>o</sup> edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

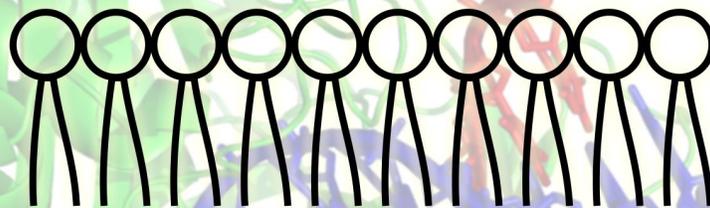
## MINI -CURSO 8

# ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM HEPATÓCITOS DE ANIMAIS DIABÉTICOS

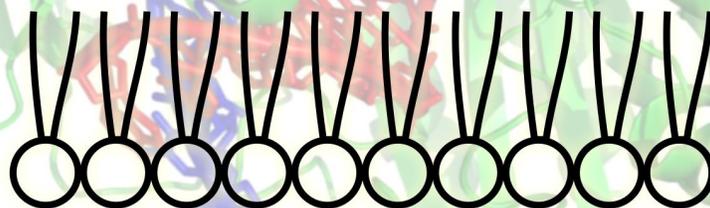


**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



***IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular***



15 a 18 de Julho de 2014

# Laboratório de Fisiologia Humana

Professores Responsáveis:

Dr<sup>a</sup>. Vilma A. Ferreira de Godoi

Dr<sup>a</sup> Maria Raquel Marçal Natali

Ministrantes do Curso:

Carlos Vinícius Dalto da Rosa

Patricia Batista Travassos

Silvia Carla Santana F. Azevedo

# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
1.1. Função glicorregulatória do fígado .....	3
1.2. Diabetes Mellitus .....	3
1.3. Modelo experimental.....	5
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>6</b>
<b>3. ROTEIRO DOS EXPERIMENTOS .....</b>	<b>7</b>
3.1. Animais.....	7
3.2. Materiais e métodos.....	7
1.Soluções de perfusão hepática .....	7
2. Técnica de perfusão de fígado in situ .....	8
3. Técnica de isolamento de hepatócitos .....	8
4. Contagem de hepatócitos e determinação do grau de viabilidade .....	9
5. Medidas de gliconeogênese a partir de lactato, glutamina e glicerol.....	10
6. Coleta de sangue para análises bioquímicas .....	11
<b>4. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>12</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Função glicorregulatória do fígado

O fígado é o segundo maior órgão do corpo, pesando cerca de 1,5 Kg no indivíduo adulto (4-5% peso corporal). Está situado na cavidade abdominal abaixo do diafragma. Seu componente estrutural básico é a célula hepática, ou hepatócito. O fígado é o órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados e armazenados para utilização por outros órgãos. Representa, portanto, uma interface entre o sistema digestivo e o sangue.

Lipídios e carboidratos são armazenados no fígado na forma de triglicerídeos e glicogênio, respectivamente. Esta capacidade de armazenar metabólitos é importante, porque supre o organismo de substratos energéticos no período entre as refeições. O fígado também é responsável pela conversão de aminoácidos em glicose, por meio de um processo enzimático complexo denominado gliconeogênese.

O fígado funciona como um importante sistema-tampão da glicose sanguínea, podendo captar glicose em grandes quantidades e convertê-la em glicogênio (glicogenogênese) e podendo liberar glicose no sangue pela mobilização do glicogênio (glicogenólise) ou pela síntese de glicose através de precursores não-carboidratos (neoglicogênese). Mecanismos glicorregulatórios precisos atuam no fígado, modulando sua ação que oscila entre captação e liberação de glicose a fim de manter a glicemia constante.

## 1.2. Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) tornou-se hoje uma epidemia mundial em função do drástico aumento no número de portadores dessa patologia nos últimos anos. No Brasil, os dados relacionados à doença revelam que até 2025, o país deverá ter 17,6 milhões de diabéticos, ou seja, pelo menos duas vezes mais que os atuais 8 milhões de portadores de doença, saltando do oitavo para o quarto lugar em termos de número total de diabéticos.

**Conceito:**

O Diabetes Mellitus (DM) é uma síndrome de comprometimento do metabolismo dos carboidratos, das gorduras e das proteínas, causada pela ausência de secreção de insulina ou por redução da sensibilidade dos tecidos à insulina. Um aspecto característico desta doença consiste na utilização inadequada dos carboidratos (glicose) com consequente hiperglicemia.

Antigos esquemas de classificação do DM eram fundamentados na idade de início da doença ou no tipo de tratamento. Uma classificação mais atual enquadra a grande maioria dos casos de DM em duas grandes categorias: diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

O DM1 é caracterizado por uma deficiência absoluta de insulina, o que torna a insulino-terapia obrigatória nestes pacientes, relacionada com múltiplas pré-disposições genéticas e fatores ambientais, ou de etiologias desconhecidas. O DM2 é caracterizado principalmente por resistência periférica à insulina induzida, por exemplo, pela obesidade. Vale destacar que parte dos pacientes evoluem ao longo dos anos para uma deficiência mais severa de insulina, tornando-se necessária a insulino-terapia. Aproximadamente 90% dos diabéticos apresentam DM2.

A DM1, anteriormente denominada diabetes mellitus insulino-dependente (DMID) ou diabetes juvenil, é definida como uma doença resultante da destruição das células  $\beta$  pancreáticas, atribuída a um processo auto-imune (DM1 imuno-mediada) ou a uma causa desconhecida (DM1 idiopática), que conduz a uma deficiência absoluta de insulina.

A maior parte da glicose que é transportada para dentro da célula vai para a via glicolítica, enquanto o excesso é transformado em glicogênio no fígado e músculos, e triglicerídeo no fígado e tecido adiposo. No DM1, as células entram em um estado de falta de glicose, devido a ausência da insulina que impossibilita a entrada de glicose nas células, e os estoques de glicogênio são exauridos. Nessas situações há degradação dos triglicerídeos no tecido adiposo liberando ácidos graxos para gerar energia e glicerol para produção de novas moléculas de glicose – gliconeogênese hepática.

### **1.3. Modelo experimental**

A estreptozotocina (SZT) é uma droga derivada da cultura de *Streptomyces acromogenes* e é uma indutora de diabetes tipo I (diabetogênica), sendo altamente seletiva e citotóxica para as células  $\beta$  pancreáticas de várias espécies animais. O mecanismo do efeito da STZ não é completamente entendido, mas sabe-se que essa droga lesa o DNA celular, que ativa a poli ADP ribose, causando diminuição crítica de NAD, bloqueando o processo secretório celular, síntese de próinsulina e liberação de insulina. Outras linhas de pesquisa defendem a geração de estresse oxidativo para o efeito diabetogênico, que acabaria matando as células  $\beta$ .

## **2. OBJETIVOS**

Avaliar a gliconeogênese hepática em hepatócitos isolados de fígado de ratos, através de dosagens de glicose e lactato, a partir dos substratos lactato, glutamina e glicerol, além das alterações plasmáticas através de dosagens de glicose e ALT (transaminase glutâmica pirúvica), em animais normais e diabéticos tipo I.

### 3. ROTEIRO DE EXPERIMENTOS:

#### 3.1 Animais

Para o desenvolvimento deste mini-curso serão utilizados ratos adultos (50 dias/180 gramas) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, em temperatura controlada (23<sup>o</sup> C/ 25<sup>o</sup> C) e com ciclos de iluminação de claro e escuro de 12 horas.

#### 3.2 Materiais e Métodos

##### 1) Soluções para Perfusão Hepática:

- Solução estoque para tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato - **Solução A:** NaCl (2,32 M; concentração final: 116 mM); **Solução B:** KCl (0,118 mol; final: 5,9 mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (24mM; final: 1,2 mM), MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (23,6 mM; final: 1,18 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (24,8 mM; final: 1,24 mM); **Solução C:** CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (50mM; final: 2,5 mM); **Solução D:** NaHCO<sub>3</sub> (0,5 M; final: 25 mM).
- Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato regular: Para preparar 1 litro (1000 ml) tomar 50mL de cada uma das soluções estoque A, B, C e D, completar com 800mL de água destilada e acertar o pH em 7,6.
- Tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato livre de cálcio: Para preparar um litro tomar 50mL de cada uma das soluções estoque A, B e D; acrescentar 850 mL de água destilada e ajustar o pH em 7,6.

##### 2) Técnica de perfusão de fígado in situ:

- O líquido de perfusão, aquecido a 37° e saturado com mistura carbogênica (com oxigenador) deve ser bombeado por meio de uma bomba peristáltica. O rato anestesiado deve ser fixado em mesa cirúrgica e sofrer laparotomia para exposição do fígado. As veias porta hepática e cava infra-hepática devem ser envolvidas em ligaduras frouxas. Canular a veia porta (fluxo de 1mL minuto<sup>-1</sup> grama de fígado<sup>-1</sup>) com tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato livre de cálcio. Em seguida canular a veia cava infra-hepática e dessangrar o fígado, aumentando o fluxo de líquido e mantendo-o por 15 minutos. Após esse período, fazer perfusão com o tampão Krebs/Hensenleit regular com colagenase 0,05% até o fígado apresentar aspecto gelatinoso.

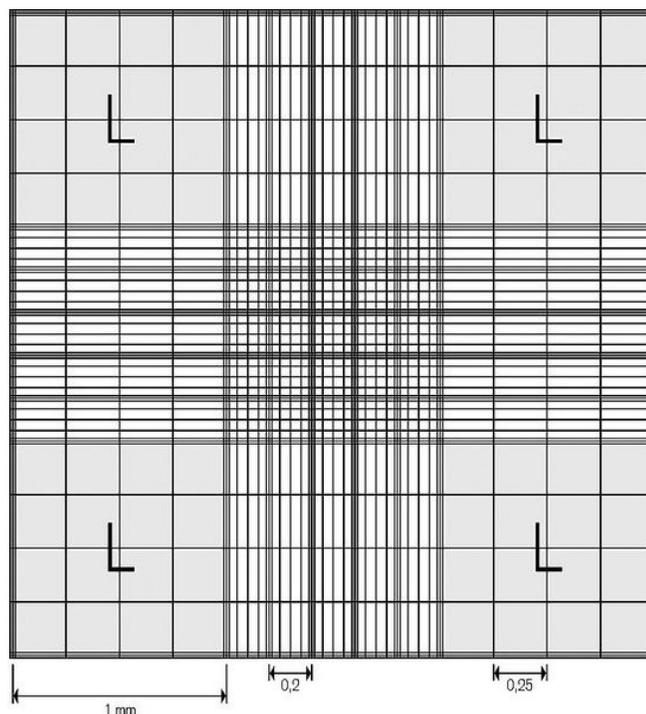
### **3) Técnica de isolamento de hepatócitos:**

- Transferir o fígado para uma placa de Petri, contendo Krebs/Hensenleit regular (com cálcio), e remover delicadamente o tecido conjuntivo que envolve o parênquima hepático. Filtrar a suspensão de hepatócitos, utilizando gaze, para retenção de outros tipos celulares e outros resíduos. Centrifugar a suspensão de hepatócitos por 4 minutos, a 530 rpm, sob temperatura de 4°C, e ressuspender o precipitado em líquido de perfusão regular sem colagenase; repetir esse processo mais 2 vezes para eliminar completamente a colagenase do meio, mantendo o volume final de 25 mL. A suspensão de hepatócitos deve ser mantida em agitação suave sobre gelo, para ser aferido o número e viabilidade das células. Esse processo é feito a partir da coleta de uma amostra de 50 µL da suspensão e adicionar em 200 µL de corante Azul de Tripán em tubo tipo eppendorf. Uma alíquota será transferida para uma câmara de Neubauer, onde será feita média do número de células vivas e viabilidade.

### **4) Contagem dos hepatócitos e determinação do grau de viabilidade:**

- Sob microscópio de luz, contar o número de células vivas e mortas em cada um dos 4 campos da câmara de Neubauer, estabelecendo uma média, e a

porcentagem de células vivas, via regra de 3. As células vivas possuem coloração amarela, enquanto as mortas são azuladas, devido a penetração do corante em seu interior.



**Figura 1.** Câmara de Neubauer.

- A partir da média de células vivas, calcula-se a quantidade de células vivas por mL de solução, multiplicando-se pelo fator de correção de volume ( $10^4$ ) e pela diluição (5 para a amostragem proposta acima). O número total de células é obtido multiplicando-se pelo volume total de suspensão (25 mL neste caso).

##### **5) Medidas de gliconeogênese a partir de lactato, glutamina e glicerol:**

- A gliconeogênese utiliza substratos não glicídicos para a produção de glicose, utilizando ATP. Para avaliar esta via biossintética utiliza-se concentrações

conhecidas de substratos incubados com os hepatócitos, que serão convertidas em produtos que podem ser mensurados.

- Serão utilizados como substrato soluções de lactato (70  $\mu$ L em 50 mL de Krebs regular), glutamina (0,037g em 50 mL de Krebs regular) e glicerol (19  $\mu$ L em 50 mL de Krebs regular)
- Após o cálculo da quantidade de hepatócitos isolados por mL de solução, calcula-se a quantidade de substrato para ser completada a 5 mL em um frasco. Cada frasco poderá ser completado a 5 mL com as soluções de substratos escolhidas, de acordo com a quantidade de células obtida no isolamento, podendo haver repetições de substratos para melhor avaliação. Frascos “controle” devem ser feitos adicionando-se apenas Krebs regular sem nenhum substrato a solução de hepatócitos.
- Os frascos devem ser incubados por 1 hora a 37°C, sob agitação em sistema oxigenado para que os substratos possam ser utilizados pelas células.



**Figura 2:** Banho de agitação.

- Em seguida o conteúdo dos frascos será passado a tubos para serem centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante será coletado em eppendorfs para dosagem da produção gliconeogênica.
- Em espectrofotômetro, o líquido obtido chamado perfusado, será dosado para glicose e lactato por meio de kits de dosagens bioquímicas específicos.

## **6) Coleta de sangue para análises bioquímicas**

- Antes do processo de canulação, será coletado 2mL de sangue via veia cava infra-hepática. O conteúdo será transferido a tubos de ensaio contendo heparina e será centrifugado a 3000 rpm por 10 min para obtenção do plasma.
- A solução de plasma obtida será utilizada para dosagens, via espectrofotômetro, de glicose e ALT (transaminase glutâmica pirúvica).

#### 4. REFERÊNCIAS

ASSOCIATIONAD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. 2005; 28 Suppl 1:S37-42

AZEVEDO, M. I.; GROSS, J. L. Aspectos especiais da dieta no tratamento do diabetes mellitus. **Rev. Assoc. Méd Bras**. v. 34, p.181-186, jul./set. 1990.

BAZOTTE, R. B. **Paciente Diabético- Cuidados Farmacêuticos**. Editora Medbook, 2010.

CARRARA, M. A.; BATISTA, M. R.; SARAHASHI, T.R.; FELISBERTO-JUNIOR, A.M.; GUILHERMETTI, M.; BAZOTTE, R. B. Coexistence of insulin resistance and increased glucose tolerance in pregnant rats: A physiological mechanism for glucose maintenance. **Life Sciences**, v.90. p.831-837, 2012.

COTRAN, S. R.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Pâncreas. In: **Patologia básica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1994. Cap. 17.

DA DELFINO, V.; FIGUEIREDO, J. F.; MATSUO, T.; FAVERO, M. E.; MATNI, A. M.; MOCELIN, A. J. Streptozotocin-induced diabetes mellitus: long-term comparison of two drug administration routes. **J. Bras. Nefrol**, 2002.

MALDONATO, A.; TRUEHEART, P. A.; RENOLD, A. E. and SHARP, G. W. G. Effects of streptozotocin in vitro on proinsulin biosynthesis, insulin release and ATP content of isolated rat islets of Langerhans. **Diabetologia**, v. 12, n. 5, p. 471-481, 1976.

SABBAG, A. R. N. **Ação da nicotinamida e da estreptozotocina no processo estímulo secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, 2000.

SANTOS, J. R. dos; ENUMO, S. R. F. Adolescentes com Diabetes Mellitus Tipo 1: seu cotidiano e enfrentamento da doença. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, 16 (2), p. 411-425, 2003.

SHIMAZU, T. Reciprocal innervation of the liver: its significance in metabolic control. In: LEVINE, R. & LUFF, R. **Adv. Metabol. Dis.**, 10 (CNS Regulation of Carbohydrate Metabolism). New York: Ed. Szabo, A. J., Academic Press, 1983. p. 355-84.

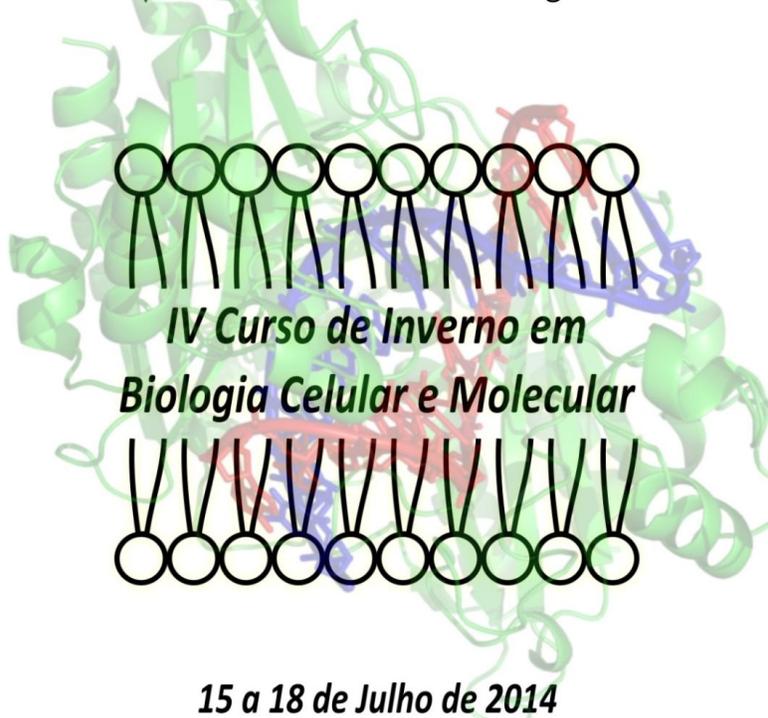
# MINICURSO 9

## INTRODUÇÃO A CITOGENÉTICA DE PEIXES: CONCEITOS E APLICAÇÕES



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*

*15 a 18 de Julho de 2014*

**LABORATÓRIO DE**

**Professor:**

Ana Luiza de Brito Portela Castro

**Pós-graduandos:**

Ana Camila Prizon

Andréa Cius

Ligia Magrinelli Barbosa

Lucas Baumgärtner

## 1. 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, apresentando rica ictiofauna para a região, contendo cerca de 60 famílias e aproximadamente 2800 espécies conhecidas (SCHAEFER, 1998). Entretanto, estima-se que existam cerca de 8000 espécies de peixes de água doce neotropicais. Essa diversidade extremamente complexa é, do ponto de vista evolutivo, um grande produto do mundo biológico.

Nas duas últimas décadas a citogenética vem contribuindo significativamente para o conhecimento da biodiversidade em peixes, apresentando uma somatória de informações e descobertas relativas a processos evolutivos nesse grupo, tais como rearranjos cromossômicos, polimorfismos estruturais e/ou numéricos, poliploidias naturais, sistemas de cromossomos sexuais, distribuição geográfica de grupos/espécies/populações (OLIVEIRA et al., 2009). Entretanto, importantes subsídios têm sido fornecidos para um melhor entendimento das relações evolutivas entre espécies e populações, assim como para a caracterização de complexos de espécies, em associação com dados de morfologia, biogeografia, comportamento e biologia molecular (ARTONI et al., 2000).

A associação entre a citogenética e a sistemática, tem se mostrado, em muitos casos, extremamente importante, complementando os estudos de identificação, distribuição e de relacionamento entre grupos naturais, normalmente baseados apenas em características morfométricas e merísticas. Além disso, o conhecimento da estrutura dos cromossomos, através de mapeamento de sequências gênicas utilizando técnicas de FISH (hibridação "*insitu*" fluorescente) aplicados em diferentes grupos de peixes tem contribuído

grandemente para o conhecimento do genoma dessa classe de vertebrados e suas implicações evolutivas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Introduzir as metodologias de obtenção de cromossomos de peixes, de técnicas de bandamentos C e AgRONS (regiões organizadoras de nucléolos) e de citogenética molecular (FISH – Microdissecção – DNA repetitivo).

### **2.2. Objetivos específicos**

**2.2.1.** Obter cromossomos mitóticos através da técnica de suspensão celular.

**2.2.2.** Caracterizar cromossomicamente a espécie utilizada, bem como comparar com grupos cladisticamente próximos.

**2.2.3.** Empregar as técnicas de bandeamento cromossômico para a obtenção da distribuição das regiões de heterocromatina (banda C) e AgRONS.

**2.2.4.** Discorrer as técnicas de citogenética molecular de hibridação “*in situ*” fluorescente (FISH), microdissecção, DNA repetitivos e suas aplicações.

## **3. MATERIAS E MÉTODOS**

### **3.1. Análises Citogenéticas**

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

### **3.2. 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 será:

1. Preparar uma solução de fermento biológico na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada.
2. Incubar a solução à 37°C por cerca de 20 minutos.
3. Injetar a solução intramuscular dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml por 100 g de peso do animal.
4. Deixar o animal em aquário bem aerado durante 24 ou 48 horas.

### **3.3. Preparação de cromossomos mitóticos**

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

### **3.4. Técnica “Air Drying” (BERTOLLO *et al.*, 1978)**

Injetar intraperitonealmente solução aquosa de colchicina (0,0025%) na proporção de 1 ml/100g do peso do animal; deixar o peixe em aquário bem aerado de 30 a 60 minutos, sacrificá-lo e retirar a porção anterior do rim e colocar o tecido em solução hipotônica de KCl (0,075); dissociar com a ajuda de uma seringa hipodérmica de vidro; hipotonizar em estufa à 37°C por 30 minutos; retirar tecidos precipitados no tubo e centrifugar por 10 minutos a 1000 RPM; retirar o sobrenadante, adicionar fixador (solução de álcool metílico e ácido acético, proporção 3:1) e ressuspender com a ajuda de uma pipeta de Pasteur de vidro e centrifugar novamente; repetir o último passo por mais duas vezes; guardar o material em eppendorf com fixador e armazenar em freezer - 20°C. Após obter a suspensão celular, pingar de 3 a 4 gotas em uma lâmina quente (60°C) e deixar secar . As lâminas com a suspensão celular serão coradas com Giemsa diluído a 5% em tampão fosfato pH 6,8 durante 8 minutos, para análise convencional ou submetidas a tratamentos de bandeamentos cromossômicos.

### **3.5. Bandeamentos Cromossômicos**

#### **3.5.1. Técnica de Impregnação por Nitrato de Prata - HOWELL e BLACK (1980)**

De posse da lâmina já contendo o material para análise, pingar uma gota de solução aquosa de gelatina em dois pontos distintos da lâmina, sobre estas gotas adicionar uma gota de água deionizada e adicionar sobre estas gotas, duas gotas de solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), e cobrir a lâmina com lamínula. Incubar em estufa a  $60^\circ\text{C}$  por 3-5 minutos, ou até que a solução adquira uma coloração caramelada. Lavar em água corrente e secar ao ar, analisar em microscópio de luz.

#### **3.5.2. Bandamento C - SUMNER (1972)**

Submeter a lâmina com o material pingado à tratamento com HCl em estufa à  $37^\circ\text{C}$ , por 15 minutos. Lavar a lâmina em água corrente e secar ao ar. Incubar a lâmina por 1 minuto e 30 segundos em solução de hidróxido de bário ( $\text{BaOH}$ ), em banho-maria à  $42^\circ\text{C}$ , com o  $\text{BaOH}$  recém preparado e filtrado. Lavar a lâmina rapidamente em solução de HCl, e depois em água corrente, deixar secar ao ar. Incubar a lâmina em solução salina de 2xSSC à  $60^\circ\text{C}$ , por 30 minutos. Lavar em água corrente e secar ao ar. Corar com Giemsa 5% durante 5-10 minutos. Lavar em água corrente.

### **3.6. Hibridação *in situ* por fluorescência – FISH**

#### **3.6.1. Preparação da sonda**

Marcação da sonda: método de nick translation utilizando o Kit BioNick<sup>TM</sup> Labeling System (Invitrogen). Mix para uma lâmina:  $1\mu\text{l}$  de DNA ( $200\text{ng}/\mu\text{l}$ );  $1\mu\text{l}$  de dNTP mix;  $1\mu\text{l}$  de mix;  $\text{H}_2\text{O}$  para completar  $9\mu\text{l}$ .

1. Misturar bem, centrifugar brevemente e incubar por 30 minutos a  $16^\circ\text{C}$  (no termociclador);
2. Parar a reação com a adição de  $1\mu\text{l}$  de Stop Buffer;
3. Acrescentar 1/10 do volume ( $1\mu\text{l}$ ) de acetato de Sódio 3M e o dobro do volume ( $22\mu\text{l}$ ) de etanol 100% gelado;

4. Misturar invertendo o tubo, centrifugar rapidamente e colocar no freezer – 70°C por 1 hora;
5. Centrifugar por 15 minutos a 15.000 rpm a 4°C;
6. Descartar o sobrenadante e adicionar 50 µl de etanol 70% gelado;
7. Centrifugar por 5 minutos a 15.000 rpm a 4°C;
8. Descartar o sobrenadante com cuidado e deixar secar;
9. Ressuspender em 6µl de água Milli Q.

### **3.6.2. Preparação cromossômica**

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

### **3.6.3. Desnaturação dos cromossomos**

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

Solução de hibridação:

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

### **3.6.4. Hibridação**

1. Colocar 30µl de solução de hibridação sobre a lamínula e inverter a lâmina sobre a lamínula.
2. Manter as lâminas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37°C *overnight*.
3. Remova a lamínula.

4. Lavar em 2xSSC, pH 7,0 a 72°C, em banho sem agitação, por 5 minutos.
5. Transferir para PBD a temperatura ambiente para proceder à detecção.

### **3.7. Prospecção de DNA repetitivo via cinética de reassociação Wei et al. (2005), com modificações de Ferreira e Martins (2008) e Vicari et al. (2010)**

Este procedimento está baseado na técnica de C0t-1 DNA (DNA enriquecido com sequências alta e moderadamente repetitivas). Brevemente, o DNA genômico será diluído para uma concentração final de 300 ng/μL em uma solução de NaCl 0,3 mol/L. A amostra será autoclavada (121 °C, 1,034 x 10<sup>5</sup> Pa) por 5 min para obter fragmentos entre 100 e 1000 pb. O DNA será então desnaturado a 95 °C por 10 min e colocado a 65 °C para re-anelamento, e posteriormente tratado com nuclease S1 (Promega) a 37 °C por 8 min. Os fragmentos de DNA obtidos serão clonados ou usados como sondas para hibridização fluorescente in situ (FISH).

### **3.8. Microdissecção**

Os cromossomos metafásicos serão diluídos para a microdissecção em solução de metanol/ácido acético 3:1, respectivamente. Essa suspensão celular será gotejada sobre uma lamínula. O material será corado em Giemsa 2% (v/v) por 5 minutos e, lavados em água destilada. As microdissecções cromossômicas serão realizadas em microscópio invertido (Olympus) equipado com microdissector mecânico (Eppendorf). Os cromossomos serão microdissectados com agulhas de vidro, capilar, com pontas de aproximadamente 0,7 μm. Após a microdissecção, a ponta da agulha contendo o material cromossômico será quebrada no interior de um microtubo, onde será realizada uma primeira reação de PCR.

### **3.9. Prospecção de DNA repetitivo por restrição genômica**

Os DNAs de representantes de peixes Neotropicais serão digeridos com enzimas de restrição seguindo as orientações dos fabricantes. A reação de digestão será incubada por 16 h em banho Maria à 37° C. Uma alíquota da

reação de digestão será então submetida à eletroforese em gel de agarose (2%). Possíveis bandas com padrão de repetição em escadas serão selecionadas no gel.

### **3.10. Medidas cromossômicas**

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

#### **3.10.1. Montagem dos cariótipos**

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

## **4. RESULTADOS ESPERADOS**

O presente mini-curso deverá proporcionar ao aluno, entendimento sobre as técnicas utilizadas nos estudos de citogenética de peixes, bem como sua aplicabilidade, como instrumento de estudo evolutivo e sistemático. Além de proporcionar a compreensão das relações genéticas entre os peixes, através das diferenças cariotípicas na macro e microestrutura cromossômica das espécies.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; BERTOLLO, L. A. C. Cytogenetics of the Neotropical fishes: methods, results and perspectives. *Biology and Health Sciences* 6: 43-60, 2000.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 2: 103-120, 1978.
- COLE, C. J.; LEAVENS, C. R. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. *Herpetological Review* 3:102, 1971.
- EGOZCUE, J. Estudios cromosómicos. Preparaciones directas. In: *Técnicas en Citogenética*: 15-37. Editorial Espaxs, Barcelona, 197.
- HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015, 1980.
- LEE, M. R.; ELDER, F. F. B. Yeast stimulation of boné marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenetic and Genome Research* 26: 36-40, 1980.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; 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.; TOLEDO, L. F. A.; FORESTI, F.; BRITSKI, H. A.; TOLEDO FILHO, S. A. Chromosome formulae of neotropical freshwater fishes. *Brazilian Journal of Genetics* 11: 577-624, 1988.
- OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry* 35:81–100, 2009.
- 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 centrom heterochromation. *Experimental Cell Research* 75: 304-306, 1972.

# MINICURSO 10

## HOMEOPATIA EM VEGETAIS

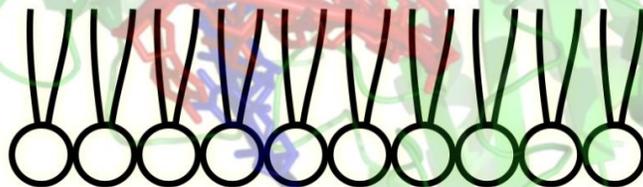


**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*



*15 a 18 de Julho de 2014*

LABORATÓRIO DE HOMEOPATIA VEGETAL

Professor:

Carlos Moacir Bonato

Pós-graduandos:

**Cintia de Oliveira Martendal**

**Gabriela Galvão Machado**

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Christian Friedrich Samuel Hahnemann**

Christian Friedrich Samuel Hahnemann nasceu no dia 10 de abril de 1755 em Meissen, no Estado da Saxônia, no leste da Alemanha. Filho de um pintor de porcelana, o garoto cresceu em um ambiente modesto e, graças a uma bolsa, pôde estudar em numa renomada escola da região.

Desde cedo, Hahnemann demonstrou grande facilidade para línguas. Além do alemão, aprendeu inglês, francês, espanhol, latim, árabe, grego, hebreu e caldeu. Tinha ainda aptidões para as ciências naturais e grande interesse pela botânica.

Iniciou o curso de Medicina na Universidade de Leipzig. Porém, insatisfeito com o enfoque exclusivamente teórico das aulas, Hahnemann transferiu-se para Viena.

Em 1781, Hahnemann defendeu sua tese de doutorado na faculdade de Erlangen, começou a praticar a medicina no povoado saxônico de Hettstedt. Meses depois, mudou-se para Dessau, onde conheceu Johanna Leopoldina Henriette Küchler, enteada de um farmacêutico. Em 1782, casaram e mudaram-se para Gommern – também no leste do país.

### **1.2. Similia similibus curentur**

Embora considerado bom médico, Hahnemann demonstrou-se desiludido com a pouca eficácia dos métodos terapêuticos usados na época. Para garantir o sustento da família, optou por traduzir obras científicas, especialmente nas áreas de química e medicina.

Em 1790, Hahnemann traduziu o tratado *Matéria Médica*, do inglês Willian Cullen, que relatava as propriedades curativas da *Chinchona officinalis*, ou quinina, contra a malária. Intrigado, Hahnemann testou em si mesmo a substância e desenvolveu sintomas semelhantes aos da doença. Subitamente, tomou consciência do que ocorreria: quinina acarretava sintomas semelhantes aos apresentados pela enfermidade que curava.

Hahnemann experimentou outras drogas como beladona, mercúrio, digital, ópio, arsênico e diversos medicamentos de uso corrente na época. Os testes confirmaram sua teoria. Cada remédio provocava uma doença similar àquela para a qual era ordinariamente receitado. *Similia similibus curentur* ou "semelhante cura semelhante". Hahnemann desvendara o princípio da homeopatia.

Hahnemann dedicaria o resto de sua vida a desvendar a cura pelo semelhante e aprofundar-se nesta premissa. O princípio "*Similia similibus curentur*" foi batizado por Hahnemann de homeopatia – do grego "homoion" similar, e "pathos" doença.

Querendo fazer dela um método eficaz de tratamento, ele experimentava as substâncias, registrava seus efeitos no organismo e passava a utilizá-las em doentes com sintomas semelhantes.

Hahnemann começou seus tratamentos aplicando grandes doses. Mas, devido a efeitos colaterais, procurou desenvolver um procedimento para proteger o paciente e evitar intoxicações. Passou a diluir as substâncias para que fossem ministradas em pequenas quantias. A nova terapia de Hahnemann era eficiente e agradável aos pacientes. Uma ótima opção aos tratamentos primitivos e sem embasamento científico da época, como a prática de sangrias, ingestões de purgantes e substâncias tóxicas.

Em 1812, Hahnemann recebeu licença para lecionar na Universidade de Leipzig. Viveu na cidade até 1821 com sua família (a esposa e 11 filhos, dos quais dois viriam a morrer). Suas críticas aos métodos de cura da época esvaziaram-lhe a sala de aula. Aos poucos alunos que restaram, ele propôs a formação de um grupo de "provadores de drogas". Neste período, redigiu uma obra onde estão descritos todos os sintomas e propriedades das substâncias testadas por ele e seus discípulos.

A controvérsia em torno de seus métodos contribuiu para que Hahnemann mudasse várias vezes de cidade. Em 1821, estabeleceu-se em Köthen, onde recebera autorização para a fabricação de seus medicamentos. Por essa época, Hahnemann escreveu seu último livro médico importante, intitulado *Doenças crônicas, sua natureza e tratamento homeopático*, publicado em 1828. Hahnemann morreu aos 88 anos, em Paris, no dia 2 de julho de

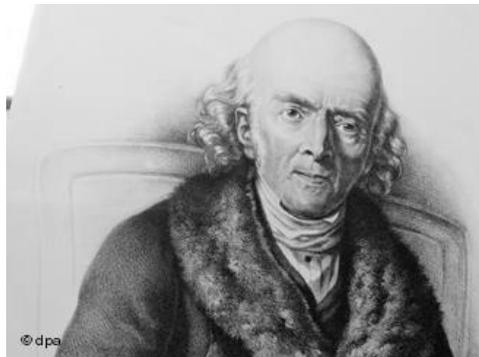
1843. Seus estudos foram rapidamente difundidos, serviram de inspiração para novas gerações de clínicos e tornaram o mundo mais saudável.

### 1.3. Homeopatia no Brasil

A homeopatia foi introduzida no Brasil por um dos discípulos de Hahnemann, o francês Benoit-Jules Mure. Mure chegou ao país em 1840 e obteve apoio de D. Pedro II para a prática, ensino e propagação da nova medicina.

A homeopatia propagou-se no Brasil, recebendo apoio do pensamento positivista no final do século 19. O método se propagou até o final da década de 20, sofrendo posteriormente um lento declínio. Nos anos 60, a homeopatia sobreviveu no país graças a nomes como os de Abraão Brickman, Alfredo de Vernieri, Paiva Ramos, David Castro e Artur de Almeida Resende Filho. Nas últimas décadas a homeopatia voltou a ganhar notoriedade e prestígio. Hoje, o Brasil é um dos países com maior número de médicos homeopatas do mundo e calcula-se que cerca de 17 milhões de brasileiros já tenham recorrido à medicina de Hahnemann.

No território nacional existem cerca de 15 mil médicos exercendo a homeopatia, 2 mil farmacêuticos e o mesmo número de farmácias especializadas. E, para quem gosta de história, existe até o Museu de Homeopatia Abraão Brickmann, na cidade de Ribeirão Preto, no interior de São Paulo.



**Figura 1:** O pai da homeopatia, o médico alemão Samuel Hahnemann

Portanto, a homeopatia é orientada por quatro princípios: lei dos semelhantes, experimentação na pessoa sadia, doses infinitesimais e medicamento único. O princípio da lei dos semelhantes estabelece que uma doença específica pode ser curada pela substância capaz de reproduzir os mesmos sintomas da doença. Ou seja: o que causa mal a alguém “saudável” pode curar alguém doente. Se um veneno produz efeitos como vômitos em uma pessoa, a versão homeopática (diluída) desse mesmo veneno poderá tratar pacientes com problemas de vômitos recorrentes, e assim por diante. A doença artificial desenvolvida pelo uso dos medicamentos homeopáticos em organismos sadios é chamada de patogenesia. A experimentação na pessoa sadia dita que os testes de medicamentos homeopáticos devem ser realizados em pessoas – nunca animais – saudáveis. Dessa maneira, é possível avaliar os efeitos objetivos e subjetivos no grupo de experimentadores (como são chamados) e encontrar, em termos gerais, o “veneno que em doses homeopáticas cura”.

As chamadas doses infinitesimais consistem na diluição drástica de um medicamento e agitação (dinamização) para “despertar” propriedades latentes. Esse princípio causa controvérsias, porque, de acordo com muitos médicos, desafia qualquer lei da física ou bioquímica conhecida: de tão diluído o remédio, é possível que não haja nenhuma molécula mensurável do princípio ativo original.

Alguns experimentos, no entanto, indicam que fenômenos ainda incompreendidos da física quântica poderiam explicar a eficácia dos medicamentos homeopáticos. O princípio do medicamento único, que suscita debate mesmo entre especialistas em homeopatia, firma que a intervenção deverá ser realizada por vez: o paciente deverá tomar o medicamento que contenha o maior número de estímulos para os sintomas que o paciente apresenta. Apenas dessa forma o médico conseguirá avaliar a eficiência da terapia de forma precisa.

De acordo com a homeopatia, o indivíduo não tem apenas uma doença: ele carrega um desequilíbrio que se manifesta de diferentes formas ao longo da vida. Por esse motivo, a função do médico homeopata é restaurar o organismo aos estágios que precedem a vida, no caminho da cura. É considerada, portanto, um tratamento preventivo e curativo. Empregando mais de 2000

remédios diferentes extraídos de substâncias vegetais, animais e minerais, a homeopatia se propõe a estimular o sistema imunológico e restaurar o equilíbrio energético do paciente com base nos sintomas e tratar qualquer doença, embora nem todos os indivíduos se beneficiem integralmente com a terapia. A homeopatia é frequentemente indicada para problemas do trato gastrointestinal, ginecológicos, dermatológicos, respiratórios e falta ou expressão exagerada de “resistência” (infecções virais e bacterianas frequentes e doenças alérgicas). Além disso, pode buscar a cura para problemas emocionais como a depressão. Contudo, pacientes que sofrem de distúrbios graves como diabetes ou câncer não devem substituir a terapia convencional – ainda considerada “soberana” em todo o mundo - por remédios homeopáticos, exceto com o consentimento do endocrinologista ou especialista responsável. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a sua prática como medicina alternativa e complementar. No Brasil, foi reconhecida como especialidade médica pelo Conselho Federal de Medicina em 1980 e é utilizada pelo Sistema Único de Saúde desde 2006.

#### **1.4. Quem podemos tratar com a Homeopatia?**

A homeopatia pode tratar as pessoas, os animais, as plantas, a água e o solo. Na agricultura, ela pode ser utilizada no controle de pragas e doenças, na defesa natural das plantas e, além disso, melhorar a produtividade das culturas. Também pode ser utilizada no solo com excelentes resultados. Deve-se ter sempre em mente que o solo (Mãe Terra) é vida. Se o solo está desequilibrado, como estarão as plantas que nele crescem? Logicamente que estarão doentes, embora os sintomas nem sempre apareçam aos nossos olhos. O tratamento com os preparados homeopáticos pode equilibrar o solo, principalmente se este estiver intoxicado por agrotóxicos (desvitalizado). Se tratarmos o solo com homeopatia, dentro de um manejo racional, estaremos melhorando todo o sistema solo-planta (ambiente), o que pode resultar em maior equilíbrio e produtividade das culturas. O fundamento da homeopatia estabelece que não há doenças mas, sim, doentes. Hahnemann relata que a doença é uma conseqüência do desequilíbrio vital do organismo. Se a

homeopatia for utilizada obedecendo a seus princípios básicos (Lei dos Semelhantes), irá estimular os sistemas de defesa dos seres.

## 2. MATERIAIS E METODOS

### 2.1. Fonte de medicamentos homeopáticos

2.1.1. Animal: Ex.: *Lachesis*, *Cantharis*,

2.1.2. Vegetal: Ex.: *Belladonna*, *Arnica montana*, *Nux vomica*

2.1.3. Mineral: Ex.: *Phosphorus*, *Sulphur*, *Calcarea carbonica*, *Arsenicum album*.

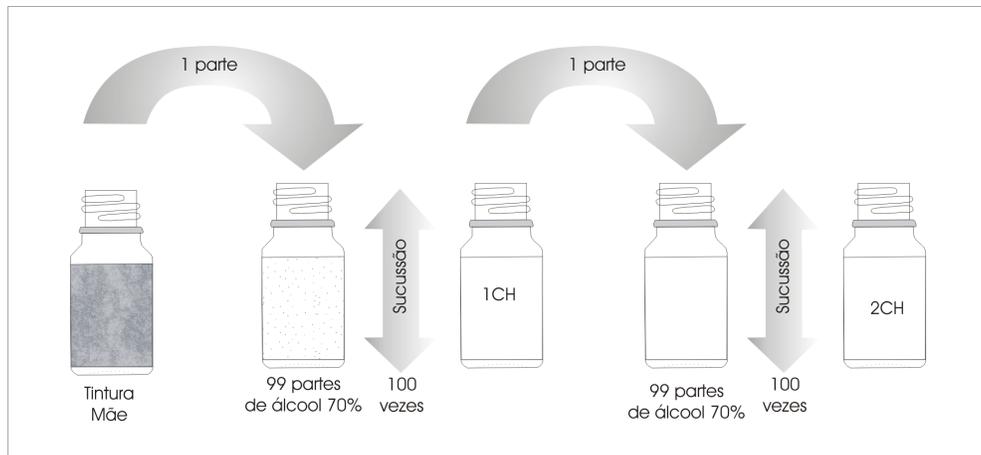
2.1.4. Bioterápicos: produtos quimicamente não definidos que servem de matéria-prima nas preparações homeopáticas.

- ecreção, excreções, produtos de origem microbiana e alergenicos:
- provenientes de produtos patológicos: Ex. *Psorinum*, *Tuberculinum* (sarcódios).
- provenientes de produtos fisiológicos. Ex. *Laccanicum*, *Lachesis*

Na agricultura é comum – e têm excelentes resultados – a aplicação de preparados homeopáticos feitos com o próprio agente causador do desequilíbrio. Tais preparados são chamados de NOSÓDIOS ou BIOTERÁPICOS. Os nosódios são muito utilizados no controle de pragas (percevejo, lagarta, formiga, besouros, carrapatos, etc.), doenças (antracnose, ferrugem, viroses, mastite, etc.).

### 2.2. Dinamização

Dinamização é o ato de *diluir* e *sucussionar* o medicamento homeopático. É a transformação da matéria pelo aumento do seu poder de informação. O **medicamento-substância** transforma-se em **medicamento-informação**. Conforme Hahnemann, “*essa mudança notável nas quantidades dos corpos naturais desenvolve os poderes dinâmicos, latentes, até agora despercebidos, como se estivessem adormecidos, ocultos*”. Como pode-se fazer a dinamização, ou seja, a diluição e a sucussão? Vejamos abaixo, o processo de dinamização, passo a passo.



### 2.2.1. Passos

- O primeiro vidro possui a tintura-mãe, ou TM (mais adiante explicaremos como preparar as tinturas-mãe).
- Pegamos 1 parte da tintura-mãe (Ex. 0,2g) e colocamos em outro vidro contendo 99 partes de álcool 70% (Ex. 19,8 g). Este processo é chamado de **DILUIÇÃO**.
- Temos aí uma diluição de 1 parte para 100 partes.
- Agita-se então o vidro por 100 vezes, com movimentos ritmados, usando um anteparo que pode ser uma lista telefônica, com um pano limpo em cima. Este processo é chamado de **SUCUSSÃO**.
- Assim, temos a primeira dinamização (diluição e succussão) que chamamos de 1CH (CH=*Centesimal Hahnemanniana*).

Se quisermos obter agora a 2CH, como faremos? Simplesmente pegamos uma parte da 1CH e colocamos em outro vidro, contendo 99 partes de álcool 70%. Da mesma forma, podemos seguir fazendo a 3CH, 4CH, 5CH, 6CH ... e assim por diante até chegarmos na dinamização de interesse. Qual a diferença de uma dinamização 1CH, 2CH e 3CH? Na 1CH, temos uma diluição de 1/100, na segunda 1/10.000, na terceira 1/1.000.000...e assim por diante. A cada dinamização, aumentam dois zeros.

Quando chegamos na 12CH, temos 24 zeros. Nesta dinamização, não temos mais a substância da origem. Mas e daí? É aqui que está o segredo da homeopatia. O que fica no líquido/sólido (veículo) é a **INFORMAÇÃO** da substância original. Para entender melhor, vejamos um exemplo: quando recebemos uma notícia, guardamos esta em nossa mente, ou seja, a notícia informa a nossa mente. No entanto, não podemos pesá-la, pois ela não tem tamanho e nem forma. Da mesma maneira, funciona a **INFORMAÇÃO** na homeopatia.

Quando diluímos e sucussionamos uma determinada substância, a informação desta substância passa para a solução, que no nosso caso é o álcool 70%. É como se a imagem da substância original permanecesse na água e/ou no álcool. Esta é uma das grandes diferenças entre um preparado homeopático e um fitoterápico ou, como se diz popularmente, **CHÁ**.

Na homeopatia há basicamente **INFORMAÇÃO**, enquanto que no chá ou fitoterápico há presença de substância. Outra diferença é que ao fazer o chá não fazemos a sucussão, como é feito ao se preparar a homeopatia. Lembrete: Homeopatia não é a mesma coisa que fitoterapia, chá não é homeopatia.

### **2.3. Preparados (nosódios) de origem vegetal:**

#### **2.3.1. Para essa tintura-mãe vamos precisar de:**

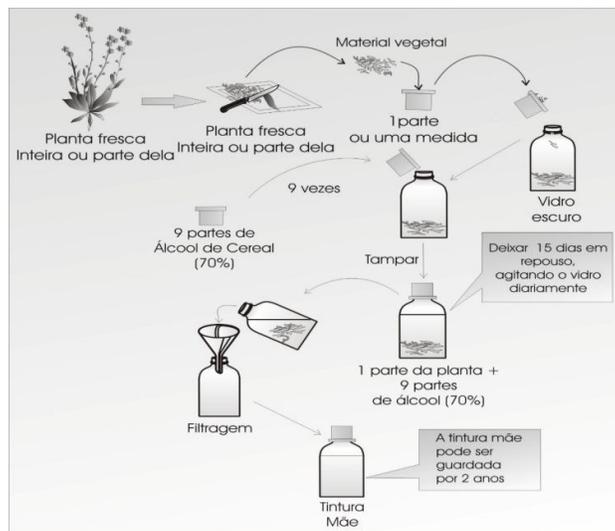
- Planta ou parte da planta.
- Álcool de cereais.
- Água destilada.
- Recipiente com medida.
- Vidros âmbar (escuro) com tampa.
- Etiqueta (rótulo).
- Funil simples.
- Filtro de papel (pode ser o filtro de café).

#### **2.3.2. Modo de preparar a tintura-mãe**

- Pegar a planta limpa, cortada em pedaços bem pequenos.

- Colocar uma parte da planta para 9 partes do **álcool a 70%**. O álcool e a planta não podem ocupar todo o espaço do frasco.
- Colocar para descansar em um vidro escuro, envolto em papel alumínio e etiquetado, em lugar seco, arejado e sem luz direta.
- Agitar o frasco 1 vez ao dia, durante 15 dias.
- Após este tempo, filtrar e colocar em um frasco escuro e protegido da luz.
- Após 48 horas de repouso, a tintura-mãe está pronta para ser dinamizada.

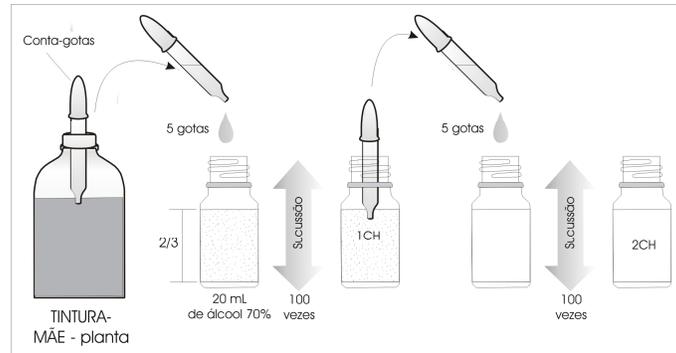
Abaixo é mostrado, passo a passo, o preparo da receita:



**Lembrete: A TINTURA-MÃE DO VEGETAL TEM VALIDADE DE 2 ANOS**

E agora, o que vamos fazer com a tintura-mãe? Precisamos dinamizar para fazer o preparado homeopático do vegetal. Como faremos isto? É muito fácil.

Veja o esquema:



- Com auxílio de um conta-gotas, colocar 5 gotas da tintura-mãe (preparada anteriormente) em um vidro contendo 20 ml de álcool de cereal 70%.
- Fazer 100 sucussões, usando um anteparo, como a lista telefônica.

Temos assim a 1CH (diluição 1/100). Para fazer a 2CH, procedemos da mesma maneira. Pegamos 5 gotas da dinamização 1CH, colocamos em outro vidro contendo 20 mL e fazemos novamente as 100 sucussões. Desta forma, temos a 2CH. Podemos seguir fazendo a 3CH, 4CH, 5CH, 6CH, 7CH e assim por diante.

## 2.4. Preparados (nosódios) de origem animal

### 2.4.1. Para o preparo desta tintura-mãe vamos precisar de:

- Animal ou parte do animal.
- Álcool de cereais.
- Água destilada.
- Recipiente contendo medida.
- Vidros escuros com tampa.
- Etiqueta (rótulo).
- Funil.
- Filtro de papel.
- Palitos de madeira, espátula.

### 2.4.2. Modo de fazer a tintura

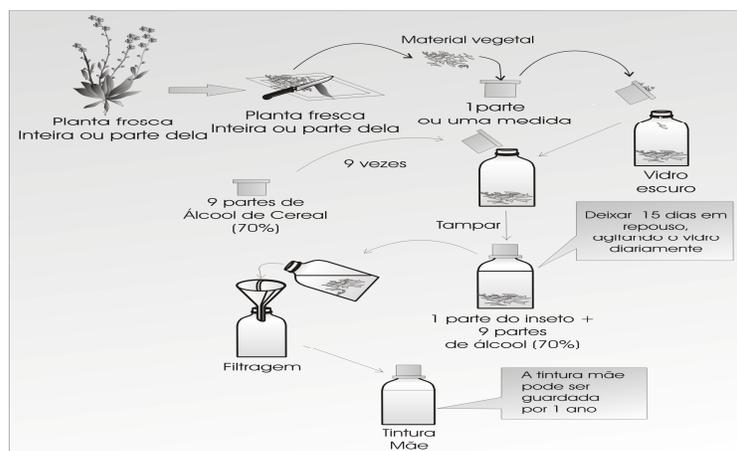
Para animais como formigas, besouros, carrapatos, caracóis, percevejos e marimbondos deve-se utilizar álcool de cereal 70%. Para animais ou partes de animais de corpo mole (lagarta, berne, lesma), o mais correto é preparar uma solução com glicerina, álcool de cereais e água destilada (1 parte de cada).

Para facilitar o entendimento, vamos ensinar a preparar a homeopatia com álcool de cereal 70%.

### 2.4.3. Passos:

- Coletar 1 medida (1 parte) de animais vivos (de preferência das diversas fases de desenvolvimento).
- Adicionar 4 medidas (4 partes) de álcool 70% ou da solução de glicerina-álcool-água (na proporção de 1:1:1).
- Etiquetar e guardar o frasco em um local seco, arejado e sem luz direta.
- Agitar o frasco 1 vez ao dia, durante 20 dias.
- Filtrar após os 20 dias.
- Colocar a etiqueta (rótulo) com todas as informações.
- Após 48 horas de repouso, a tintura-mãe está pronta para ser dinamizada.

Veja o esquema abaixo para maiores detalhes



**Lembrete:** A TINTURA-MÃE DO ANIMAL TEM VALIDADE DE 1 ANO.

Como já falamos, as homeopantias são feitas a partir da tintura-mãe. Utilizamos a escala centesimal (CH), criada por Hahnemann. É necessário passar pela dinamização, que é a diluição seguida da sucussão.

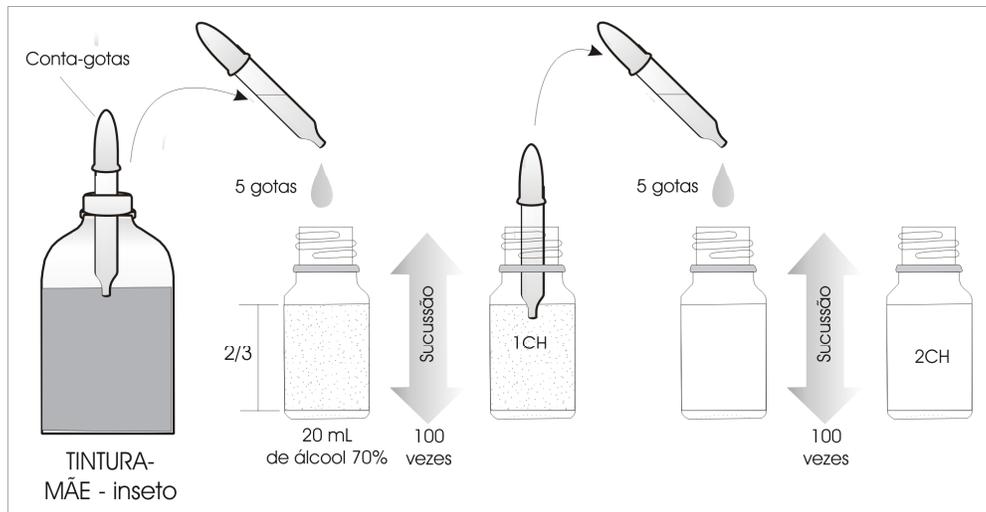
CH = Centesimal Hahnemanniana

#### **2.4.4. Vamos precisar:**

- Frascos (30 mL), um para cada dinamização.
- Recipientes com capacidade para 20 mL (graduado), uma para cada dinamização.
- Seringas de 1 mL, uma para cada dinamização.
- Álcool 70%.
- Água destilada.
- Anteparo (lista telefônica) ou braço mecânico.
- Etiquetas.

#### **2.4.5. Modo de fazer a dinamização:**

Em um frasco de 30 mL, colocar 19,8 mL do álcool 70% e 0,2 mL da tintura-mãe. Fechar o frasco e fazer a sucussão, ou seja, sacudir o vidro vigorosamente contra um anteparo (ex. lista telefônica), no mesmo ritmo, 100 vezes. Está pronta a homeopatia 1CH. Para preparar a 2CH, é só pegar outro frasco limpo e esterilizado e colocar 19,8 mL de álcool 70% e 0,2 mL da 1CH, aplicando 100 sucussões. Para preparar a 3CH, utilizamos a 2CH, para a 4CH precisamos da 3CH e assim por diante. A partir da 4CH pode-se dinamizar em álcool 30%.



## 2.5. Duração dos medicamentos

A validade dos medicamentos homeopáticos é dada em função do seu teor alcoólico. No entanto, a boa conservação esta relacionada também ao armazenamento em local adequado e cuidados no momento do seu preparo.

Água pura – 2 dias

Álcool 10% - 30 dias

Álcool 30% - 1 ano

Álcool 70% - 3 anos

Álcool 90% - 5 anos

## 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Homeopatia simples: Alternativa para a Agricultura Familiar H765h /  
 Coordenação de Carlos Moacir Bonato. Marechal Cândido Rondon: Gráfica Líder,3 ed. 2012.

<http://www.dw.de/h%C3%A1-250-anos-nascia-o-pai-da-homeopatia/a-1547046>

<http://saude.ig.com.br/homeopatia/>

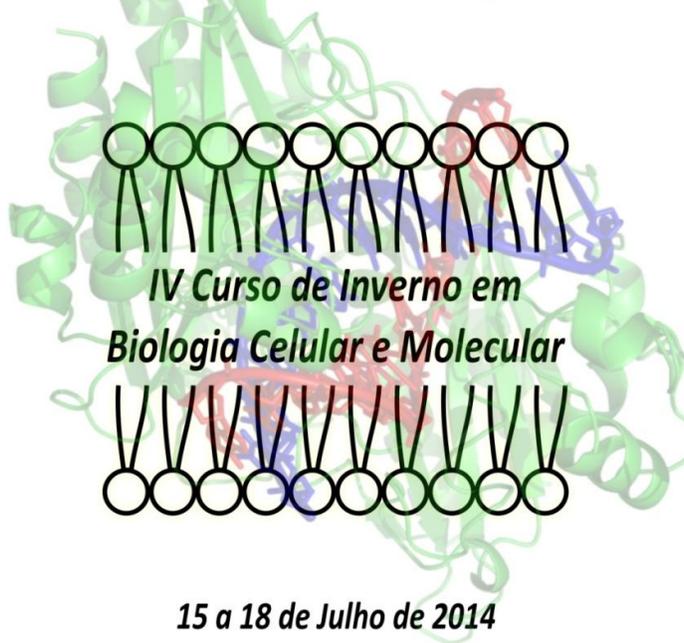
# MINICURSO 11

## ATIVIDADE DE MITOCÔNDRIAS ANIMAL E VEGETAL



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*

*15 a 18 de Julho de 2014*

**LABORATÓRIO DE OXIDAÇÕES BIOLÓGICAS**

**Professores:**

Emy L. I. Iwamoto

Jorgete Constantin

**Pós-graduandos:**

Danielle A. M. Hermoso

Eduardo Hideo *Gilgioni*

Julia Mewes

Lilian Brites Campos

Gislaine Mantovanelli

Marcio S. Mitto

Mauro Cezar Barbosa

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. 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.

## **1.2. Fracionamento celular**

A separação dos componentes celulares pode ser obtida por centrifugação fracionada. Esta técnica baseia-se no uso sucessivo de diferentes velocidades de centrifugação as quais, por sua vez, geram diferentes acelerações centrífugas. A velocidade necessária para obter a sedimentação de determinada fração subcelular pode ser previamente determinada com base nos valores dos coeficientes de sedimentação de cada fração.

Os valores dos coeficientes de sedimentação, em geral expressos como unidades de  $10^{-13}$  s que são conhecidas como Svedberg (S), podem ser determinados previamente em uma centrífuga analítica ou através de dados disponíveis na literatura especializada. Este coeficiente é proporcional ao tamanho e forma da partícula, portanto, partículas com alto coeficiente de sedimentação (massa maior) sedimentam com rotações relativamente menores.

O isolamento das frações celulares por centrifugação fracionada só é possível se as células forem rompidas e separadas, um procedimento denominado homogeneização. Os homogenatos de tecidos animais ou vegetais contêm as frações subcelulares em suspensão, enquanto que os componentes solúveis estão em solução.

### 1.3. A mitocôndria

Durante uma experiência em 1898 o cientista alemão Carl Brende 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 deu as 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 e seu principal componente de trabalho é o espaço mais interno (a matriz) e a membrana interna que o circunda. A matriz mitocondrial contém uma grande variedade de enzimas, incluindo aquelas que convertem piruvato e ácidos graxos em acetil-CoA e aquelas que oxidam Acetil-CoA em CO<sub>2</sub> através do ciclo do ácido cítrico. Essas reações de oxidação produzem grandes quantidades de NADH (e de FADH<sub>2</sub>)

A cadeia respiratória utiliza a energia derivada do transporte de elétrons para bombear prótons (H<sup>+</sup>) 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<sup>+</sup> 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.

#### **1.4. Principais características das mitocôndrias de tecidos animais**

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  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e do metabolismo de alguns aminoácidos e glicose, entre outras. Os estoques de  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADP}^+$  são separados do citosol enquanto os nucleotídeos de adenina, ATP e ADP comunicam com o citosol por meio de um carreador específico.

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 (UQH<sub>2</sub>-citocromo *c* oxidoreductase) e complexo IV (citocromo *c* oxidase). O complexo V é a ATP-sintase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP sintase) e todos os complexos estão localizados na membrana interna mitocondrial. A cadeia respiratória transfere elétrons do NADH para o oxigênio, o aceptor final, e a energia da diferença de potencial redox (1,1V) é usada para criar um gradiente eletroquímico de prótons que então guia a síntese de ATP. O

gradiente de prótons resulta da extrusão de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas pelos complexos I, III e IV. A dissipação do gradiente de prótons, que retornam à matriz através complexo V, é acoplada à síntese de ATP, preservando a energia da oxidação de substratos. Em mitocôndrias do tecido adiposo marrom, um tecido presente em recém-nascidos e animais adultos hibernantes, uma proteína chamada termogenina permite que os prótons retornem à matriz mitocondrial sem passar pelo complexo V, desacoplando o fluxo de prótons da geração de ATP, de modo que a energia é dissipada na forma de calor.

### **1.5. A cadeia respiratória**

A cadeia respiratória na membrana mitocôndria interna contém três complexos enzimáticos respiratórios principais através dos quais os elétrons fluem do NADH para o  $O_2$ . Cada um desses complexos é capaz de bombear  $H^+$  quando os 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  $NADH \rightarrow$  complexo da NADH-desidrogenase  $\rightarrow$  ubiquinona  $\rightarrow$  complexo do citocromo b-c<sub>1</sub>  $\rightarrow$  citocromo c  $\rightarrow$  complexo da citocromo oxidase  $\rightarrow$  oxigênio molecular ( $O_2$ ).

O acoplamento do transporte de elétrons energeticamente favorável ao bombeamento de  $H^+$  para fora da matriz cria um gradiente eletroquímico de prótons. Os complexos enzimáticos respiratórios acoplam o transporte de elétrons energeticamente favorável com o bombeamento de  $H^+$  para fora da matriz mitocondrial. Este resultante é utilizado para sintetizar ATP por outro complexo protéico transmembrana, a ATP-sintase. Por meio do qual os prótons  $H^+$  fluem de volta para a matriz.

## **1.6. Os Inibidores e os desacopladores ajudam a entender o funcionamento da mitocôndria**

A sequência de eventos na cadeia de transporte de elétrons foi elucidada por meio do uso de inibidores específicos e mais tarde confirmada pela medida do potencial redox padrão dos componentes redox. A taxa de consumo de  $O_2$  por uma suspensão de mitocôndrias é uma medida sensível da atividade da cadeia de transporte de elétrons. Os compostos que inibem o transporte de elétrons, devido ao seu efeito no consumo de  $O_2$ , incluem a rotenona (uma toxina vegetal usada por índios da Amazônia para envenenar peixes e usada também como inseticida), o amital (um barbitúrico), a antimicina A (um antibiótico) e o cianureto.

A adição de rotenona ou amital a uma suspensão de mitocôndrias causa bloqueio do transporte de elétrons no complexo I, a antimicina A bloqueia o complexo III e o cianureto bloqueia o transporte de elétrons no complexo IV. Cada um desses inibidores interrompe o consumo de  $O_2$ . O consumo de oxigênio reinicia-se após a adição de substâncias cujos elétrons entram na cadeia de transporte após o bloqueio. Por exemplo, a adição de succinato a mitocôndria bloqueada pela rotenona restaura o transporte de elétrons e o consumo de  $O_2$ . Durante este curso realizaremos experimentos dessa maneira, com inibidores do transporte de elétrons que permite revelar o ponto de entrada de elétrons a partir de vários substratos.

Mitocôndrias supridas com succinato respiram e sintetizam ATP apenas quando o ADP e o 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 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.

### **1.7. A mitocôndria como alvo da ação de fármacos e produtos naturais**

As mitocôndrias são importantes alvos da ação de compostos químicos, como fármacos ou fitoterápicos, porque muitas destas substâncias podem provocar ruptura da membrana mitocondrial ou ainda inibir a função mitocondrial através de diferentes mecanismos. As drogas podem seqüestrar coenzima A ou podem inibir as enzimas da  $\beta$ -oxidação, da transferência de elétrons ao longo da cadeia respiratória, ou a ATP-sintase. As drogas também podem destruir o DNA mitocondrial, inibir a sua replicação, diminuir os transcritos mitocondriais, ou dificultar a síntese de proteínas mitocondriais. Muitas vezes, um único medicamento tem muitos efeitos diferentes sobre a função mitocondrial. Nos animais, por exemplo, uma deficiência grave da fosforilação oxidativa hepática compromete a formação do ATP, levando a disfunção celular ou necrose. Também pode secundariamente inibir a  $\beta$ -oxidação, causando assim esteatose, e pode também inibir o catabolismo de piruvato, levando a acidose láctica. Todos esses efeitos apresentam conseqüências devastadores que levam ao coma e a morte. Assim novas moléculas usadas em terapias devem sempre ser avaliadas quanto a possíveis efeitos mitocondriais. Ao longo deste curso iremos investigar os possíveis efeitos de drogas sintéticas e extratos vegetais, que estão sendo utilizados pelo nosso laboratório sobre a mitocôndria.

### **1.8. 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 Clark.

O Eletrodo de Clark 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.

### **1.9. A avaliação da velocidade de consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas**

Quando o meio de reação contendo substrato, é adicionado, a corrente gerada é a máxima possível para a concentração de oxigênio de uma solução aquosa saturada com ar. A 37°C isto corresponde a 190µM; a 25°C a solubilidade aumenta para 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.

#### **1.10. Isolamento de mitocôndrias animais e vegetais**

O isolamento de frações subcelulares, a partir de tecidos animais, é uma técnica bastante difundida. As frações purificadas (mitocôndrias, peroxissomos, microssomos e vesículas de membrana plasmática), podem ser utilizadas para o estudo de atividades enzimáticas, associadas ou não, a fenômenos de transportes. Um dos tecidos mais amplamente utilizados como fonte destas frações, é o fígado. O interesse pelo isolamento de frações subcelulares a partir de fígado de rato vem crescendo muito, não só pela facilidade com que com que estas frações podem ser obtidas, comparando com outros tecidos, mas também pela importância do fígado no controle do metabolismo de

carboidratos, como órgão alvo da ação drogas, hormônios e em fenômenos envolvidos em alterações fisiopatológicas como a falência geral dos órgãos.

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, 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.

## **2. OBJETIVOS**

Este curso fará uma abordagem comparativa das técnicas para isolamento e medidas das atividades de mitocôndrias animais e vegetais. Será enfatizada a importância da mitocôndria animal como alvo da ação de fármacos e produtos naturais, e da mitocôndria vegetal como alvo de aleloquímicos fitotóxicos.

## **3. 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.

### **3.1. Isolamento e atividade respiratória de mitocôndria vegetal**

#### **3.1.1. Material biológico**

As sementes de *Glycine max* (L.) Merrill da variedade BRS 283 foram obtidas da Embrapa soja.

#### **3.1.2. Isolamento de mitocôndria vegetal**

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

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

#### **3.1.3. Determinação da atividade respiratória de mitocôndrias isolada de *G. max***

O consumo de oxigênio das mitocôndrias isoladas será medido polarograficamente, a 25°C, como foi descrito para a respiração de embriões. O meio de reação contendo manitol 0,4M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,0mM, MgCl<sub>2</sub> 5,0mM, albumina bovina livre (BSA) de ácidos graxos 1,0% (p/v), Tris-HCl (pH 7,2)

10mM, DMSO 2% e óleo essencial de *C. winterianus* (0, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03 e 0,06% (v/v)) será adicionado à câmara de acrílico de acordo com o tratamento a ser avaliado. Será adicionado quantidades de mitocôndria de modo a se obter de 1,4 a 1,6 mg de proteína mitocondrial. As avaliações relacionadas ao consumo de oxigênio iniciará pela adição de L-malato 10 mM + NAD<sup>+</sup> 50 mM ou NADH 1,0 mM. A respiração basal é representada pelo consumo de oxigênio dos primeiros 5 minutos aproximadamente. ADP 160 µM será adicionado iniciando a respiração do estado III. O estado IV da respiração é considerado como o consumo de oxigênio após a exaustão do ADP adicionado. A razão ADP/O e o controle respiratório foram calculados de acordo com Chance & Williams (1955). Para a discriminação da respiração via citocromo-oxidase (COX) e respiração via oxidase alternativa utilizou-se o inibidor KCN 1 mM (KERN *et al.*, 2009).

#### 3.1.4. Serão efetuados seis ensaios:

1. 40uL de succinato 0,5 M  
5uL de ADP 50 mM  
40uL de TMPD-Ascorbato  
20mM
2. 40uL de α-cetoglutarato 0,5M  
5uL de ADP 50mM
3. 40uL de α-cetoglutarato 0,5M  
5uL de ADP 50mM  
5uL de Rotenona 2mM  
40uL de succinato 0,5 M  
2uL de Antimicina 1,5mM  
40uL de TMPD-Ascorbato  
20mM  
40uL de KCN 80mM
4. 40uL de succinato 0,5 M  
5uL de ADP 50 mM  
40uL de TMPD-Ascorbato  
20mM
5. 40uL de α-cetoglutarato 0,5M  
5uL de ADP 50mM
6. 40uL de α-cetoglutarato 0,5M  
5uL de ADP 50mM  
5uL de Rotenona 2mM  
40uL de succinato 0,5 M  
2uL de Antimicina 1,5mM  
40uL de TMPD-Ascorbato  
20mM  
40uL de KCN 80mM

## 3.2. Isolamento e consumo de oxigênio de mitocôndrias animais

### 3.2.1. Procedimentos para o isolamento de mitocôndrias animais

Inicialmente, passaremos a descrição do meio de isolamento de mitocôndrias

**Obs.** Para todos os meios deve-se utilizar água de água bidestilada.

<b>Solução estoque</b>	<b>Volume a ser adicionado (ml)</b>	<b>Concentração final (mM)</b>
<b>Manitol 0,5 M</b>	100	200
<b>Sacarose 1,0 M</b>	19	76
<b>Tris 1,0 M, pH 7,4</b>	0,5	2
<b>EGTA 0,2 M</b>	0,25	0,2
<b>PMSF</b>	0,25	0,1
<b>H<sub>2</sub>O q.s.p 250 ml*</b>	130	

- ✓ Adicionar albumina bovina livre de ácidos graxos (FFA – *free fatty acids*) a uma concentração final de 50 mg% (0,125g em 250 ml). Acertar pH para 7,4.

As mitocôndrias serão obtidas pela homogeneização do fígado de rato Wistar macho (180-200g) no meio de isolamento acima (0 a 4°C) utilizando-se um homogeneizador Dounce.

O homogeneizado será filtrado e em seguida será centrifugado a 536 g (2.200 rpm) em centrífuga refrigerada. O sobrenadante será coletado e centrifugado a 7.080 g (8.000 rpm). O sedimento passará por dois ciclos de lavagens, por ressuspensão e recentrifugação do sedimento a 6.392 g (7.600 rpm), as mitocôndrias serão ressuspensas no mesmo meio, até concentração protéica de cerca de 40 a 50 mg/mL.

### 3.3. Procedimento para a dosagem de proteínas

Na determinação do teor de proteínas foram utilizados o reativo A (30 mg de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 4 g de NaOH em 1000 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada), o reativo B ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a 2%), o reativo C (tartarato de sódio a 4%) e o reativo D (reagente de Folin Ciocalteu 1 N).

No dia do experimento, misturar os reativos **a**, **b** e **c**, na seguinte ordem e volumes: 0,1 ml de **b**, 0,1 ml de **c** e 10 ml de **a**(**rigorosamente nesta ordem**).

Diluir a mitocôndria 200 vezes (995  $\mu\text{L}$  de água + 5  $\mu\text{L}$  da suspensão mitocondrial).

✓ Adicionar em tubos de ensaio (Triplicata, exceto o branco)

	<b>Branco</b>	<b>Padrão</b>	<b>Amostra</b>
<b>Água</b>	100 $\mu\text{L}$	-	-
<b>Padrão</b>	-	100 $\mu\text{L}$	-
<b>Amostra diluída</b>	-	-	100 $\mu\text{L}$
<b>Mistura reativa</b>	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$
<b>AGITAR CADA TUBO E AGUARDAR 10 MIN. (AMBIENTE)</b>			
<b>Folin 1N</b>	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
<b>AGITAR CADA TUBO E AGUARDAR 10 MIN. (AMBIENTE)</b>			

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

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

### 3.4. Determinação do consumo de oxigênio por polarografia

Para a realização destes ensaios, o seguinte meio de reação deve ser preparado:

Solução estoque	Volume a ser adicionado (ml)	Concentração final (mM)
Manitol 0,5 M	25	250
KCl 1,0 M	0,5	10
TRIS 1,0 M, pH 7,4	0,5	10
EGTA 0,2 M	0,25	0,2
Fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4	2,5	5,0
H <sub>2</sub> O q.s.p 50 ml*	21,25	

Adicionar albumina bovina (FFA) a uma concentração final de 50 mg% (0,025g em 50 ml). Acertar pH para 7,4.

Adicionar albumina bovina livre de ácidos graxos (FFA) a uma concentração final de 50 mg% (0,025g em 50 mL). Acertar pH para 7,4. Incubar alíquotas da suspensão mitocondrial (1,0 a 1,5 mg) em 2,0 mL do meio de reação (mantido em banho-maria 37°C) na câmara de incubação termostatzada acoplada ao sensor de oxigênio.

Após estabilização do registro, acrescentar um substrato oxidável: 40 µl de succinato 0,5 M ou 40 µl de α-cetoglutarato 0,5 M (concentração final = 10 mM). (**Ensaio 1 e 2, ver abaixo**).

Acompanhe o consumo de oxigênio através do registrador potenciométrico. Esta é a respiração inicial (ou estado II) e deve ser bastante lenta.

Em seguida, adicionar 5 µl de ADP 50 mM (0,25 µmoles). Com a adição do ADP, inicia-se o estado III da respiração, que apresenta maior velocidade de consumo de oxigênio. Quando todo ADP adicionado tiver sido consumido, a respiração volta a ficar lenta, caracterizando o estado IV da respiração mitocondrial.

No primeiro ensaio, adicionar ao final 40 µl de TMPD-Ascorbato para esgotar a quantidade de oxigênio da câmara.

### 3.5. Ação de inibidores e desacopladores

- Verificar a ação dos inibidores clássicos rotenona, antimicina e cianeto;
- Verificar a ação do desacoplador 2,4-dinitrofenol
- Verificar o efeito da oligomicina

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

#### 3.6.1. Velocidade de consumo de oxigênio:

A velocidade da respiração deve ser calculada em nmol de oxigênio consumido por minuto por miligrama de proteína (**nmol. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>**), considere a solubilidade do oxigênio no ar como sendo igual a **190 µM** a 37°C.

G (cm) -----190 x 10<sup>-6</sup> M

V (cm)-----x M

x M

x nº de moles -----1L

y -----2 x 10<sup>-3</sup> L ⇒ volume de incubação (2 ml)

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

= nmol. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>

#### 3.6.2. Calculo do fator

**[(190 x 2)/G(cm)]/mg de proteína**

*O fator já sai em nmol. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>, 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 nmol. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>*

### 3.6.3. Determinação do controle respiratório (RC):

RC é o indicador do controle da fosforilação

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

$$RC = \frac{\text{velocidade de consumo } O_2 \text{ no estado III}}{\text{velocidade de consumo } O_2 \text{ no estado IV}}$$

O consumo de  $O_2$  no estado III é definido como a respiração durante a fosforilação do ADP adicionado; o consumo de  $O_2$  no estado IV é a respiração após o ADP adicionado ter sido consumido.

### 3.6.4. Determinação da razão ADP/O:

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

$$\text{Razão ADP/O} = \frac{\text{ADP adicionado}}{\text{consumo extra de } O_2 \text{ durante o estado III}}$$

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

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

nº de moles =  $M \times V$  (L), sendo que foram adicionados  $5 \times 10^{-6}$  L de uma solução de ADP com concentração de  $50 \times 10^{-3}$  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  $O_2$  durante o estado III

G (cm) -----  $190 \times 10^{-6}$  M

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

x M

$x$  nº de moles -----1L

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

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

nº de átomos-grama = Y

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

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

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

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

PESSAYRE, D.; FROMENTY, B.; BERSON, A.; ROBIN, M.A.; LETTÉRON, P.; MOREAU, R.; MANSOURI, A. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. Drug Metab Rev. ; 44(1):3 4-87, 2012.

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.

# MINICURSO 12

## TÉCNICAS DE PERFUSÃO HEPÁTICA E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS

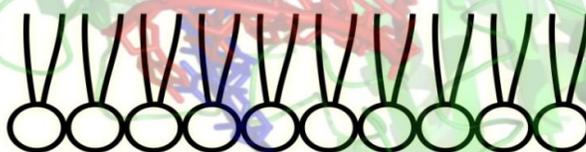


**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*



*15 a 18 de Julho de 2014*

**LABORATÓRIO DE METABOLISMO HEPÁTICO**

**Professores:**

Adelar Bracht  
Anacharis Babeto de Sá Nakanishi  
Cristiane Vizioli de Castro Ghizoni  
Jurandir Fernando Comar

**Pós-graduandos:**

*Amanda Caroline Shubert*  
Geferson de Almeida Gonçalves  
Juliany Fontoura da Silva Pereira  
Maiara Morselli Coelho Barbosa  
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.

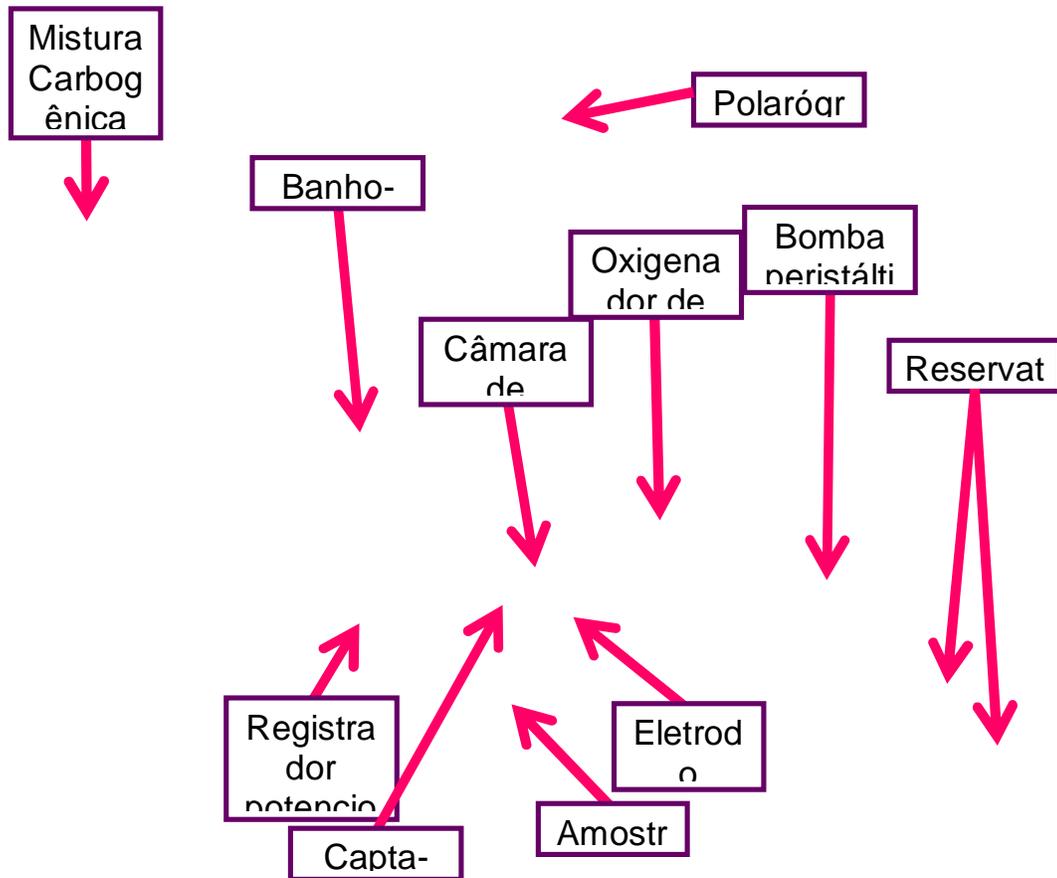
## 1.1. Perfusão hepática

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, de tal maneira que o experimentador pode controlar a qualidade do líquido arterial e colher, para posterior análise, o líquido venoso (perfusado).

No fígado em perfusão podem ser medidas várias vias metabólicas, como por exemplo, a neoglicogênese, a glicólise, a glicogenólise, o consumo de oxigênio, a cetogênese, a captação de ácidos graxos, a frutólise, o metabolismo do glicerol, a biotransformação de drogas e assim por diante. Por exemplo, agliconeogênese 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-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<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>/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 termostaticada pelo banho-maria com bomba de circulação externa. O cilindro de alumínio está separado do meio ambiente por uma cobertura cilíndrica de plástico transparente, mantendo-se no seu interior uma atmosfera 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, que 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 consequente 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 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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.

O radical  $\text{HO}\bullet$  é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{HO}\bullet$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxida proteínas que apresentem

resíduos de metionina ou grupo tiol muito reativos, por exemplo,  $\text{GSH.O} \bullet \text{O}_2^-$  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, glutatiónaperoxidase e glutatiónaredutase, além das moléculas glutatióna reduzida, glutatióna 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, 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.

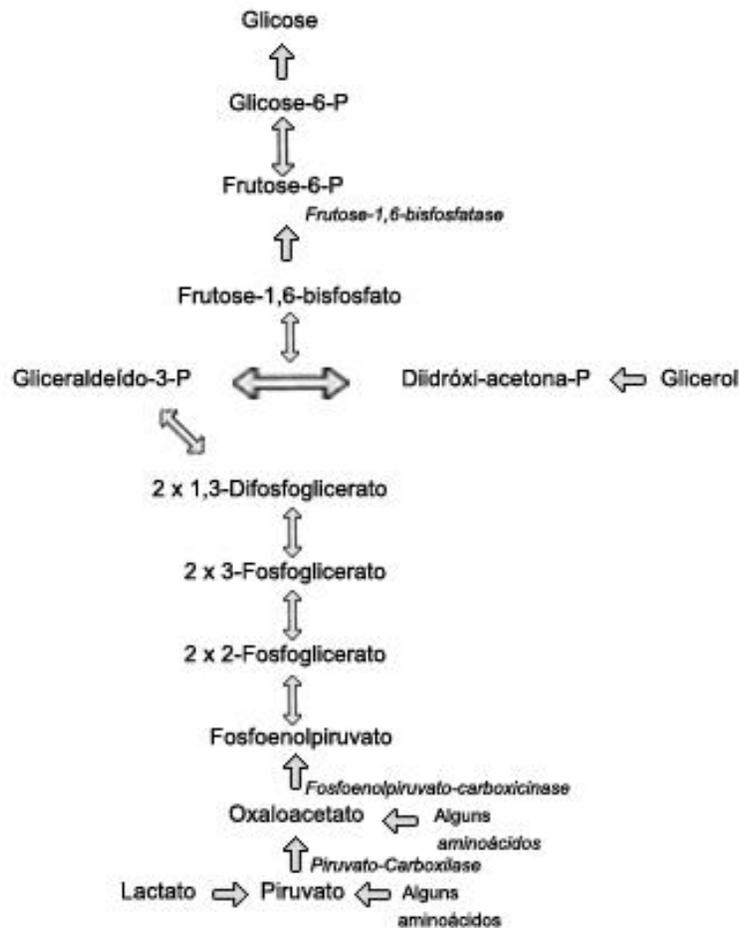
### **1.4. Gliconeogênese hepática**

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 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. Os rins também são locais importantes para a gliconeogênese, pois somente as suas células e as do fígado possuem quantidades suficientes de glicose-6-fosfatase, a enzima que remove o grupo fosfato da glicose-6-fosfato para produzir glicose.



**Figura 2. Gliconeogênese hepática.** (Fonte: Cingolani; Houssay; 2003, p.514).

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  $\text{NAD}^+$ , 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 deaminada 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 demonstradas 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 piruvatocarboxilase ou da fosfoenolpiruvatocarboxiquinase encontrem-se alteradas nesta situação. A atividade da piruvatocarboxilase 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 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) suspenso em óleo mineral. Os animais que apresentem lesões características em 18 dias após a injeção adjuvante serão selecionados

para os experimentos. Os ratos de pesos semelhantes foram injetados com óleo mineral e serviram como controles. Todos os experimentos de indução de artrite adjuvante foram 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**

I. Soluções estoque para o tampão Krebs/Henseleit-bicarbonato:

- Solução A: NaCl (2,32 M; concentração final: 116 mM);
- Solução B: NaHCO<sub>3</sub> (0,5 M; final: 25 mM);
- Solução C: KCl (0,118 M; final: 5,9 mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (24 mM; final: 1,2 mM), MgCl<sub>2</sub> (23,6 mM; final: 1,18 mM); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (24,8 mM; final: 1,24 mM);
- Solução D: CaCl<sub>2</sub> (50 mM; final 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**

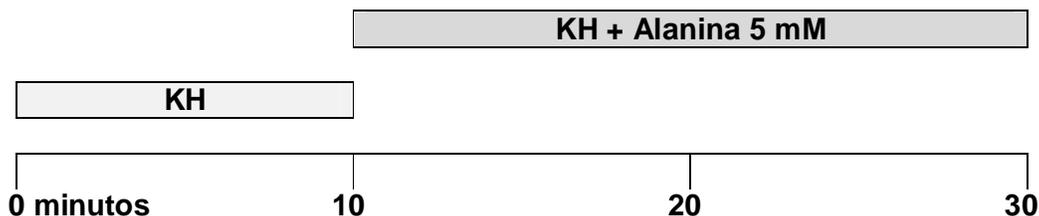
Para remoção cirúrgica do fígado o rato é previamente anestesiado com tiopental sódico (50 mg/kg).

- O animal é deitado em decúbito dorsal numa plataforma ao lado da câmara do fígado;
- O abdômen é aberto longitudinalmente e o tecido conjuntivo que cerca o fígado é seccionado com cuidado para evitar hemorragias;

- O estômago deve ser separado do esôfago da seguinte forma: fixam-se duas ligaduras ao redor do esôfago, uma distal outra proximal em relação ao estômago e corta-se o esôfago entre as duas ligaduras;
- 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;
- Uma ligadura frouxa deve ser colocada ao redor da veia cava inferior, acima do rim direito;
- Ajusta-se o fluxo do líquido de perfusão em torno 8 ml/minuto;
- 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 20 ml/minuto para a inserção da cânula da veia cava. Então, colocam-se duas ligaduras ao redor da veia canulada. Amarra-se a num mesmo laço as porções anteriormente seccionadas do diafragma;
- Fecha-se a ligadura frouxa colocada anteriormente na veia cava inferior;
- Deve-se remover o fígado cortando por baixo do diafragma, segurando a cânula da veia cava através das 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 amostra de 2 em 2 minutos conforme o esquema abaixo.



Tubos:

0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

### 3.2.4. Dosagem enzimática de glicose por kit

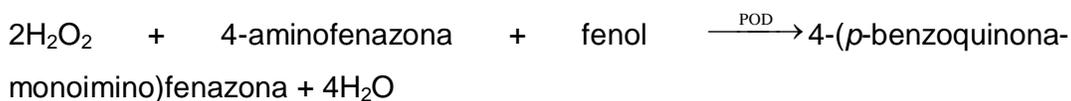
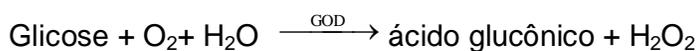
I) Procedimento:

	Branco	Padrão	Amostra
Mistura reativa	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL
KH	0,4 mL	-	-
Padrão	-	0,4 mL	-
Perfusado	-	-	0,4 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.



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  $\mu\text{M}$  no papel do registrador isto corresponde a x cm.

II) Após a substituição do ar pela mistura carbogênica ( $\text{O}_2:\text{CO}_2/95:5$ ), a concentração do oxigênio aumenta e, depois de algum tempo, estabiliza-se em torno de 860  $\mu\text{M}$ . 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).

## **3.3. Estresse oxidativo**

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

Os conteúdos de GSH e a atividade da enzima antioxidante CAT serão determinados no homogenato de fígados de ratos controle e artríticos. 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 1,2 g. Essa porção será macerada e homogeneizada com homogeneizador Van Potter em 9mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) (tudo em gelo). Para a determinação da atividade específica da CAT, o homogenato será centrifugado a 9800 rpm por 15 minutos 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. Determinação da atividade específica da catalase (CAT) e princípio da técnica**

A atividade da enzima CAT será avaliada pela decomposição enzimática do  $H_2O_2$  medida diretamente por espectrofotometria em 240 nm. O sobrenadante (0,02 mL diluído 100 vezes) será adicionado a 0,98 mL de uma solução contendo Tris 50 mM, EDTA 0,25 mM e  $H_2O_2$  30 mM (pH 8,0) e a queda da absorvância monitorada por um minuto a 25°C ( $\epsilon=33,1 M^{-1}$ ).

### **3.3.4. Procedimento para a dosagem de proteínas**

Misturar os reativos a, b e c, na seguinte ordem e volumes: 0,12mL de b, 0,12 mL de c e 12mL de a.

Diluir o homogenato e o sobrenadante 100 vezes (990 $\mu$ L de água + 10 $\mu$ L da amostra do homogenato).

Adicionar em tubos de ensaio:

	Branco	Padrão	Amostra
Água	100µL	-	-
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%.

### 3.3.5. 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 piruvatocarboxilase 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. **Oxidativestateoftheliverofratswithadjuvant-inducedarthritis**. 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, 1982.

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

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.

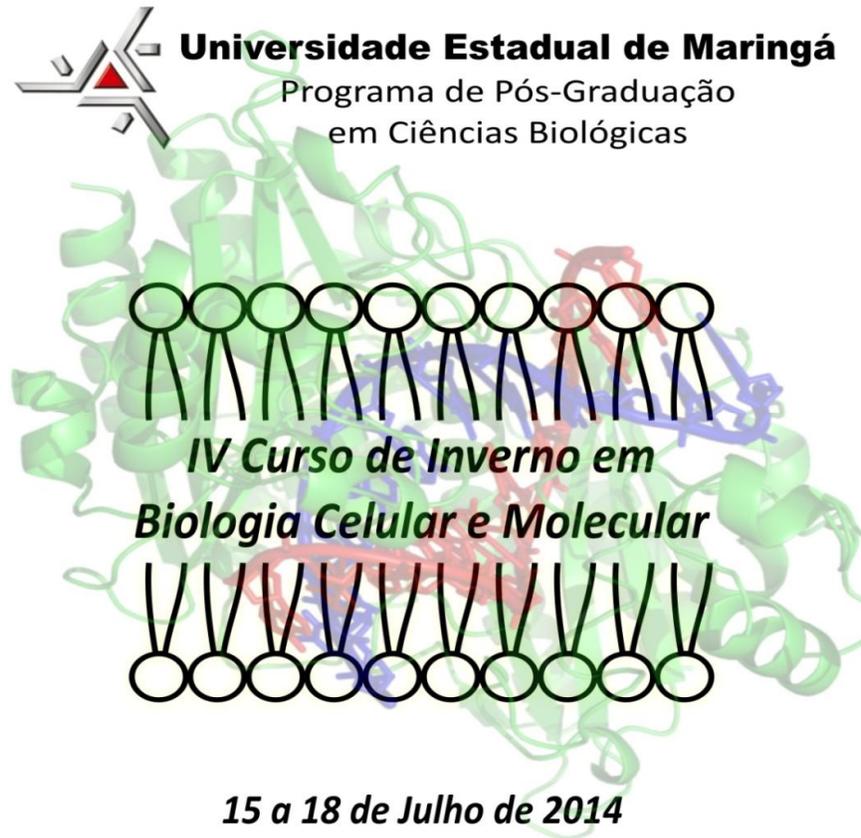
# MINICURSO 13

## ESTUDO DA GENOTOXICIDADE DE FÁRMACOS E DE PRODUTOS NATURAIS ATRAVÉS DE TESTES *IN VIVO* E *IN VITRO*



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



***IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular***

***15 a 18 de Julho de 2014***

**LABORATÓRIO DE GENÉTICA DE MICROORGANISMOS**

**Professor**

Marialba A. Alves Castro Prado

**Pós-graduandos:**

Janicéle Fernandes Morais

Juliane Rocha de Sant'Anna

Tais Susane Pereira

## ENSAIO DE HOMOZIGOTIZAÇÃO EM LINHAGEM DIPLÓIDE DE *ASPERGILLUS NIDULANS* IN VIVO.

### 1. Introdução

O ascomiceto *Aspergillus nidulans* é um fungo holomórfico, que se propaga através de esporos sexuais (ascósporos) e assexuais (conídios). O ciclo de vida de *A. nidulans* apresenta uma grande diversidade, sendo dividido em ciclo vegetativo, ciclo assexual ou conidiogênese, ciclo parassexual e ciclo sexual ou ascosporigênese. O ciclo vegetativo inicia-se através da germinação de ascósporos ou de conídios, ambos haplóides e uninucleados. Os esporos são dispersos como células em dormência, originando colônias com as mesmas propriedades daquela que lhe deu origem. O ciclo parassexual, por sua vez, inicia-se com a formação do heterocário, que consiste na existência de núcleos haplóides geneticamente distintos num mesmo citoplasma, os quais, após a fusão, originam núcleos diplóides heterozigotos, sujeitos a sucessivas divisões mitóticas. Durante essas divisões, dois processos podem ocorrer: não-disjunção-cromossômica e o crossing-over mitótico (Becker e Castro-Prado, 2006).

O crossing-over mitótico ocorre no período G2 do ciclo celular, e conduz à homozigose os genes localizados em posição distal ao ponto de permuta, sempre que uma cromátide recombinante e uma paternal migrarem para o mesmo pólo mitótico (Tischfield, 1997; Sant'Anna *et al.*, 2009; Castro-Prado *et al.*, 2009; Franco *et al.*, 2010).

*A. nidulans* apresenta um ciclo celular com extensa fase G2, período em que os cromossomos encontram-se duplicados, facilitando a ocorrência do crossing-over mitótico. Linhagens diplóides heterozigotas de *A. nidulans* podem ser construídas, através do ciclo parassexual, com marcadores genéticos em heterozigose, de tal forma que permitam a detecção da recombinação mitótica (Becker e Castro-Prado, 2006; Sant'Anna *et al.*, 2009)

O potencial recombinagênico de substâncias químicas pode ser estudado em *A. nidulans* através do Índice de Homozigotização, que avalia a indução de homozigose em genes previamente presentes em heterozigose em uma linhagem diplóide (Pires e Zucchi, 1994).

A descoberta do ciclo parassexual em *A. nidulans* foi descrita por Pontecorvo e Roper em 1952, devido à existência de mutantes para coloração de conídios e de

mutantes deficientes para alguns requerimentos nutricionais, que ao serem inoculados juntos, permitiam a formação de recombinantes prototróficos em meio mínimo e com conídios com coloração verde como as linhagens selvagens, sem ocorrência de ciclo sexual.

O ponto inicial do processo parassexual é a heterocariose, que determina a existência de núcleos de composição genética diferente em um citoplasma comum, que ocorre em virtude da anastomose entre as hifas de linhagens geneticamente diferentes e complementares, neste heterocário pode ocorrer a fusão de núcleos haplóides, originando núcleos diplóides heterozigotos, distintos das linhagens paternas (Azevedo, 2008).

## **2. OBJETIVOS**

- 2.1.** Apresentar os procedimentos básicos para a obtenção de uma linhagem diplóide;
- 2.2.** Apresentar como calcular o HI para verificar a ocorrência, ou não, do crossing-over mitótico.

## **3. MATERIAIS E METODOS**

### **3.1. Linhagens**

As linhagens mestras UT448 e UT196 (haplóides) de *A. nidulans* foram adquiridas dos estoques de Utrecht (Holanda). A linhagem diplóide UT448//UT196 foi obtida conforme proposto por Roper (1952).

### **3.2. Meios de Cultura**

Meio Mínimo (MM) corresponde ao meio Czapek-Dox e meio Completo (MC) consiste do MM suplementado com solução de vitaminas e fonte de nitrogênio. Os meios são preparados conforme descrito por Miyamoto *et al.* (2007). Os meios Seletivos consistem em MM suplementado com os requerimentos nutricionais das linhagens mestras (UT448, UT196) omitindo-se um requerimento por vez, em cada tipo de meio seletivo. O pH dos meios de cultura será ajustado ao valor 6,0 e a temperatura de incubação será de 37°C.

### **3.3. Avaliação da toxicidade**

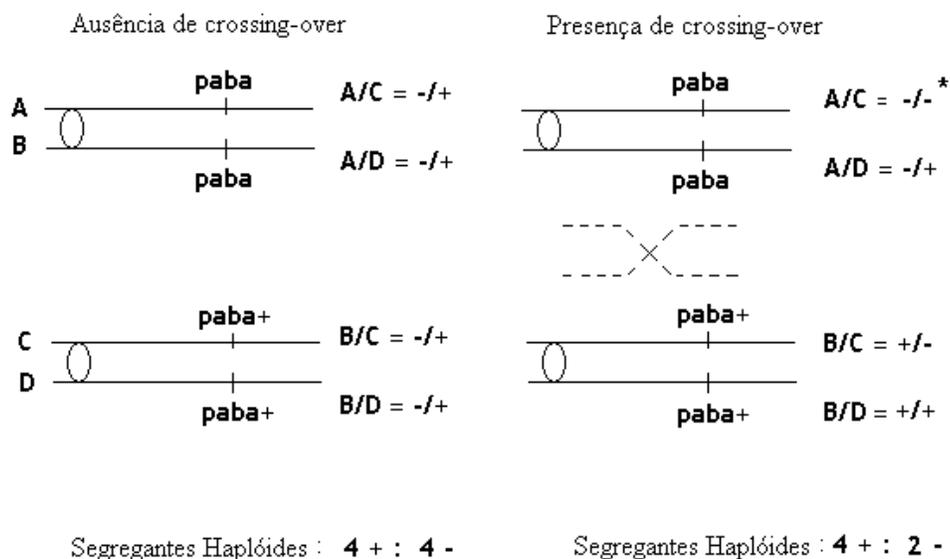
Conídios das linhagens diplóides UT448//UT196 serão inoculados no centro de placas de Petri contendo MC (controle), MC + substância teste. As placas serão incubadas à 37°C e os diâmetros das colônias serão avaliados após 48, 72 e 96 horas de incubação. Os valores obtidos em presença e em ausência da substância teste são comparados estatisticamente utilizando-se o teste *t* de Students.

### **3.4. Obtenção dos diplóides tratados com a substância teste**

Conídios dos diplóides UT448//UT196 serão inoculados no centro de placas de Petri contendo MM e MM + substância teste, as quais serão incubadas por cinco dias à 37°C. O tratamento produzirá variantes (ou setores) mitóticos nas colônias, os quais serão selecionados e purificados para os testes de recombinação. Tais setores poderão ser diplóides heterozigotos +/- ou -/+, ou homozigotos +/+, porém nunca diplóides -/-, pois estes não crescem em MM (Pires e Zucchi, 1994). Os setores diplóides serão então transferidos individualmente para quatro pontos equidistantes de 15 placas contendo MC+ benlate, agente haploidizante, e incubadas a 37°C por seis dias. Os segregantes mitóticos então obtidos serão purificados em MC. Para análise do *crossing-over* mitótico apenas os segregantes mitóticos haplóides serão utilizados. Conídios de cada setor haplóide serão transferidos individualmente para 25 posições definidas (modelo 5x5) em placas de MC. Após dois dias de incubação, as colônias serão transferidas para meios seletivos (MS) apropriados, para determinação do fenótipo dos segregantes haplóides.

### **3.5. Cálculo do Índice de Homozigotização (HI) e parâmetros de avaliação**

O HI é definido como a razão entre o número de segregantes prototróficos e o número de segregantes auxotróficos. Desta forma, na ausência de *crossing-over* entre um determinado gene e o centrômero, o valor do HI será igual a 1,0 (4+ : 4-). Por outro lado, se um evento de *crossing-over* ocorrer no intervalo em estudo, o valor do HI será igual a 2,0 (4+ : 2-) (Figura 1) (Pires e Zucchi, 1994). Substâncias que apresentarem valores de HI iguais ou superiores a 2,0 serão caracterizadas como potencialmente recombinagênicas.



**Figura 1.** Origem dos diplóides heterozigotos (+/- e -/+) e homozigotos (+/+) através do *crossing-over* mitótico entre o gene *paba* e o centrômero. (\*) Diplóides auxotróficos (-/-) não se desenvolvem em MM.

## TESTE DE MICRONÚCLEO EM CULTURA DE LINFÓCITOS HUMANOS *IN VITRO*

### 1. Introdução

A avaliação da frequência de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico humano foi estudada por Countryman e Heddle em 1976, mostrando a possibilidade de se medir o dano cromossômico através de um tecido de mais fácil acesso, porém havia a dificuldade na diferenciação das células que haviam passado por um ciclo de divisão das que não haviam ainda se dividido.

A análise de micronúcleos com bloqueio da citocinese, em linfócitos do sangue periférico, permite a análise de micronúcleos especificamente em células binucleadas antes da citocinese, o que proporciona um método simples para detectar e medir os danos ao DNA cromossômico e a instabilidade cromossômica em células de mamíferos (Fenech e Morley 1985). O micronúcleo pode ser originado principalmente a partir de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não são capazes de migrar com os demais cromossomos durante a anáfase da divisão celular (Fenech, 1999). Evidências experimentais mostram que o erro no reparo de quebras em duplas fitas do DNA (DSB), a hipometilação de citosinas em sequência centromérica e pericentromérica, e defeitos no cinetocoros,

no eixo e no ponto de controle da mitose pode levar à formação de micronúcleos (Cullinane *et al.*, 2000; Gissesson *et al.*, 2008; Murgia *et al.*, 2008; Zyss e Gergely, 2009; Fenech *et al.*, 2011).

A presença de micronúcleo em linfócitos de sangue periférico é extensivamente utilizada na epidemiologia molecular citogenética e em estudos de genética toxicológica como um biomarcador, de dano cromossômico e eventos de instabilidade genômica, em populações humanas expostas a agentes genotóxicos e é prospectivamente associado com risco aumentado de câncer (Boffeta *et al.*, 2007; Fenech *et al.*, 2011).

O teste de micronúcleo é considerado objetivo, rápido e com significativa precisão e, portanto amplamente utilizado para detectar a atividade clastogênica e aneugênica de compostos químicos (Lorge, 2008).

Para a pesquisa de micronúcleos serão realizadas culturas de linfócitos de sangue venoso periférico humano pela técnica de macrocultura de Moorhead *et al.* (1960) modificada, com adição de fitohemaglutinina.

Os micronúcleos originados pela perda de cromossomos inteiros são primariamente formados por falha no fuso acromático, no cinetócoro ou em outras partes do aparelho mitótico, ou podem derivar por quebras de pontes nucleoplasmáticas (PNPs) durante a anáfase. As PNPs ocorrem quando os centrômeros de cromossomos, cromátides ou anéis dicêntricos são tracionados para polos opostos da célula durante a anáfase. Adicionalmente os micronúcleos podem ser gerados pelo processo de formação de *bud*, na interfase. Os *buds* são morfologicamente similares aos micronúcleos, com exceção da conexão nucleoplasmática que os liga ao núcleo, a qual pode ser espessa ou fina. O diâmetro dos micronúcleos geralmente varia entre 1/16 e 1/3 do diâmetro de um dos núcleos do linfócito binucleado, têm formato redondo ou oval, não são refringentes e apresentam a mesma coloração dos núcleos principais, mas ocasionalmente podem apresentar uma coloração mais intensa (Sharbel *et al.*, 2011).

## **2. OBJETIVO**

- 2.1.** Apresentar como se realiza uma cultura de sangue periférico;
- 2.2.** Preparar e corar lâminas para observação de micronúcleos;
- 2.3.** Identificar e diferenciar através de observação microscópica células mono, bi, tri e tetranucleadas com e sem micronúcleos.

## **3. MATERIAIS E METODOS**

### **3.1. Linhagem celular**

Para o estudo, serão recrutados, sujeitos saudáveis, do sexo masculino, com idades variando entre 18 e 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumantes, não etilistas, sem exposição recente à radiações, agrotóxicos ou a medicamentos que possam interferir nos resultados dos ensaios, como por exemplo, anticoncepcionais.

### **3.2. Seleção das concentrações testadas**

As concentrações da substância teste serão determinadas pelo IM (Índice Mitótico). A OECD nº 473 e 487 (The Organisation for Economic Co-operation and Development) recomendam que no mínimo três concentrações sejam analisadas, onde a maior delas demonstre uma redução significativa do IM (superior a 50%).

### **3.3. Controles e Substância teste**

Em todos os experimentos, culturas não-tratadas de linfócitos serão utilizadas como controle negativo. Para controle positivo será usada uma droga com reconhecida capacidade clastogênica, neste caso a Mitomicina C.

### **3.4. Obtenção dos linfócitos do sangue periférico**

Cerca de 10 mL de sangue será coletado por venopunção com seringa descartável contendo anticoagulante heparina sódica. Para obtenção do plasma o

sangue será deixado em repouso à temperatura ambiente para decantação e em seguida centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos.

### **3.5. Preparação do meio de cultivo e suspensão da camada de linfócitos**

O meio base para cultivo de linfócitos será o RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino e L- glutamina. A estimulação da divisão dos linfócitos será realizada pela fitohemaglutinina também adicionada ao meio base. Após preparação do meio em quantidade adequada, este será dividido em frascos de cultura que receberão 5 mL cada. Por meio de uma pipeta Pasteur estéril a camada de linfócitos juntamente com o plasma serão ressuspensos e adicionados gota a gota nos frascos de cultura. Os frascos serão homogeneizados e incubados a 37 °C até o dia do tratamento.

### **3.6. Cultura**

Os tratamentos deverão se iniciar após um período de 24 horas do início da incubação. A citocalasina B após 44 horas do início da incubação será adicionada em todos os frascos para obtenção de células binucleadas. As culturas serão colhidas após um período de 72 horas de incubação e então transferidas para tubos cônicos, centrifugadas e em seguida hipotonizadas com solução KCl. As culturas serão novamente centrifugadas e fixadas com solução fixadora de metanol: ácido acético 3:1 (v/v). Este processo será realizado duas vezes.

### **3.7. Preparo e coloração das lâminas**

Pingar de 3 a 4 gotas da suspensão celular já fixada em lâminas limpas e armazenadas em água destilada gelada. Deixar as lâminas secarem e corar com corante Giemsa.

### **3.8. Análise de micronúcleos**

Para cada cultura serão analisadas 1000 células binucleadas quanto à presença de micronúcleos, buds e pontes nucleoplasmáticas. As células serão

observadas em microscópio de luz com aumento de 400X, sempre pelo mesmo indivíduo. Para o cálculo do IPBC (Índice de Proliferação com Bloqueio da Citocinese) serão analisadas para cada cultura, 500 células, de acordo com o proposto por Surralles et al. (1995).  $IPBC = N1 + 2N2 + 3x(N3 + N4)/500$  (N1 a N4: número de células viáveis com 1,2,3 e 4 núcleos).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Azevedo JL. Genética de Microrganismos. Goiânia: Editora UFG, 2008. 536p.
- Becker TA, Castro-Prado MAA. Parasexuality in asexual development mutants of *Aspergillus nidulans*. Biol Res 2006; 39: 297-305.
- Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Puskaierova D, Znaor A, Kelecsenyi Z, Kurtinaitis J, Rachtan J, Forni A, Vermeulen R, Bonassi S. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. Am J Epidemiol 2007; 165:36-43.
- Castro-Prado J, Franco CC, de Sant'Anna JR, Miyamoto CT, Castro-Prado MAA. Recombinogenic activity of fluoxetine in *Aspergillus nidulans*. Drug Chem Toxicol 2009; 32: 338-343.
- Countryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated of human lymphocytes. Mutat Res 1976; 41: 321-332.
- Cullinane C, Cutts SM, Panousis C, Phillips DR. Interstrand cross-linking by adriamycin in nuclear and mitochondrial DNA of MCF-7 cells. Nucleic Acids Res 2000; 28:1019-1025.
- Fenech M, Morley AA, Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res 1985; 147:29-36.
- Fenech M. Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine. Mutat Res 1999; 428:299-304.
- Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. Mutagenesis. 2011; 26: 125–132.
- Franco CC, Castro-Prado J, Rosada LJ, Sant'Anna JR, Castro-Prado MA. Mitotic recombination: a genotoxic effect of the antidepressant citalopram in *Aspergillus nidulans*. Exp Biol Med (Maywood) 2010; 235:1257-1262.
- Gisselsson D. Classification of chromosome segregation errors in cancer. Chromosoma 2008; 117:511-519.

- Lorge E, Hayashi M, Albertini S, et al. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test: I. Theoretical aspects. *Mutation Research* 2008; 655:1–3.
- Miyamoto CT, Sant'Anna JR, Franco CC, Castro-Prado MA. Genotoxicity (mitotic recombination) of the cancer chemotherapeutic agents cisplatin and cytosine arabinoside in *Aspergillus nidulans*. *Food Chem Toxicol* 2007; 45:1091-1095.
- Moorhead PS, Nowel PC, Mellman WJ, Batipps DM, Hungerford DA. Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; 20:613-616.
- Murgia E, Ballardín M, Bonassi S, Rossi AM, Barale R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat Res* 2008; 639:27-34.
- OECD Guidelines for testing of chemicals. N°473. *In vitro* mammalian chromosomal aberration test. Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, 1997.
- OECD Guidelines for testing of chemicals. N°487. *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (Draft proposal). In: Development OECD-0a, Ed. Paris, 2010.
- Pires LT, Zucchi TMAD. A new method to detect potential genotoxic agents using mitotic crossing-over in diploid strains of *Aspergillus nidulans*. *Brazil J Genetics* 1994; 17:371-376.
- Roper JA. Production of heterozygous diploids in filamentous fungi. *Experientia* 1952; 8:14-15.
- Sant'Anna JR, Miyamoto CT, Franco CCS, Miguel OG, Cunico MM, Côcco LC, Yamamoto CI, Júnior CC, Castro-Prado MAA. Genotoxicity of *Achillea millefolium* essential oil in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. *Phytother Res* 2009; 23: 231-235.
- Sharbel WM, Riegel M, et al. *Citogenética Humana*. Porto Alegre: Artmed, 2011. 336p.
- Surrallés J, Xamena N, Creus A, Catalan J, Norppa H, Marcos R. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 1995; 341:169-184.
- Tischfield JA. Loss of heterozygosity or: How I learned to stop worrying and love mitotic recombination. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 995-999.
- Zyss D, Gergely F. Centrosome function in cancer: guilty or innocent? *Trends Cell Biol* 2009; 19:334-346.

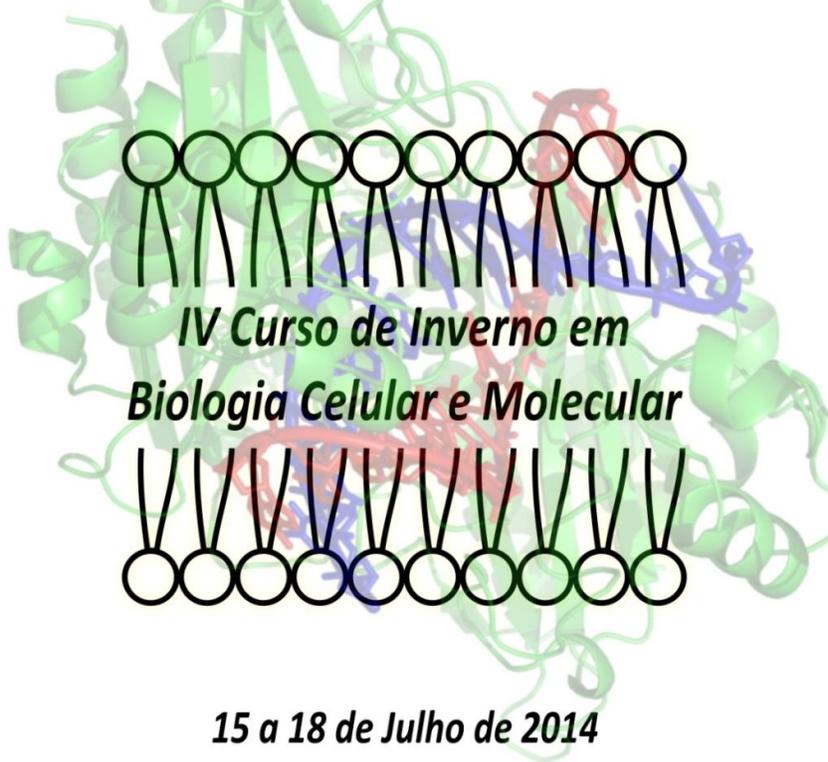
# MINICURSO 14

## PROGRAMAÇÃO METABÓLICA E SECREÇÃO DE INSULINA: ORIGEM E DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*

*15 a 18 de Julho de 2014*

**Laboratório de Biologia Celular da Secreção – LBCS  
Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias**

Audrei Pavanello  
Ananda Malta  
Douglas Lopes de Almeida  
Flávio Andrade Francisco  
Laize Peron Tófolo  
Rosiane Aparecida Miranda  
Tatiane Aparecida Ribeiro Domingos

Maringá – Paraná

## 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 América (EUA). Correntemente 34% da população dos EUA é, clinicamente, considerada obesa (IMC>30) e 68% são sobrepesados (IMC>25) mais que o dobro da média em todo o mundo ([Janesick and Blumberg, 2011](#)). Recentemente vem sendo observado uma epidemia de obesidade também em países em desenvolvimento, incluindo o Brasil ([Martins et al., 2004](#), [Sawaya et al., 2004](#)).

Um dos maiores problemas do estudo da obesidade é que a regulação do balanço energético é de grande complexidade, envolvendo causas multifatoriais, tais como fatores genéticos, neurais e endócrinos entre outros. O metabolismo é um alvo muito importante para disfunção do controle do peso corporal, incluindo os níveis de insulina na circulação (Plagemann, Heidrich *et al.*, 1992; Hill e Peters, 1998; Rodrigues, De Souza *et al.*, 2007). Estudos vêm mostrando que dentre as várias possíveis causas, a obesidade pode ser provocada por uma programação metabólica no início da vida pré e/ou perinatal, fato que se deve a alterações metabólicas que induzem o indivíduo a um desequilíbrio nas vias centrais (orexigênicas e anorexigênicas) de controle que regulam o balanço energético ([Vickers et al., 2000](#), [Breier et al., 2001](#), [Plagemann, 2005](#), [Krechowec et al., 2006](#), [Armitage et al., 2008](#)).

Alimentação rica em gordura interrompe o complexo equilíbrio de mediadores metabólicos e endócrinos, como leptina, insulina e glicocorticóides que controlam o gasto de energia e ingestão de alimento (Fehm, Kern *et al.*, 2006; Badman e Flier, 2007; Gerozissis, 2008). No outro extremo, a subnutrição ainda hoje afeta inúmeros países em todo o mundo, sendo os países subdesenvolvidos os principais alvos das consequências fisiopatológicas dessa injúria (De Moura e Passos, 2005). Os efeitos da desnutrição, como baixo peso, menores reservas energéticas, dentre outros, vem sendo sobrepostos

nos últimos anos pela obesidade (Batista Filho e Rissin, 2003; Siqueira, Appolinario *et al.*, 2004; Hallal, Wells *et al.*, 2005). Quando ocorrida no início da vida, a subnutrição é responsável por programar permanentemente o indivíduo para distúrbios metabólicos na vida adulta (Plagemann, Harder *et al.*, 2000; Coupe, Dutriez-Casteloot *et al.*, 2009).

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

O estado metabólico no SNC é mediado em parte pelos níveis circulantes de insulina e leptina (Abizaid e Horvath, 2008; Obici, 2009). O ARC atua integrando esses sinais periféricos e essa informação é repassada a vários alvos hipotalâmicos de segunda ordem para que ocorram respostas adequadas para cada situação metabólica (Yoshimatsu, Egawa *et al.*, 1993; Gao e Horvath, 2008). Como o hipotálamo constitui um dos principais centros de ativação do sistema nervoso autônomo (SNA), essas respostas são encaminhadas e os sinais autônômicos são transmitidos por dois principais componentes eferentes: Sistema Nervoso Simpático (SNS) que secreta noradrenalina, agindo através dos receptores adrenérgicos e Sistema Nervoso Parassimpático (SNP) que secreta acetilcolina que age através de, principalmente, receptores muscarínicos, em vários tecidos da periferia, incluindo o pâncreas (Ashcroft e Ashcroft, 1992; Yamaguchi, 1992; Ahren, 1999). As eferências do SNA para as células beta pancreáticas desempenham funções importantes na regulação da secreção de insulina, de maneira geral a ativação do SNP potencializa a secreção de insulina estimulada pela glicose (Gilon e Henquin, 2001) ao passo que o SNS inibe (Ahren, 2000).

Há décadas surgiram hipóteses de que os modelos de obesidade genéticos e experimentais apresentam um desarranjo na atividade do SNA,

sendo o componente parassimpático hiperativo enquanto o simpático tem atividade reduzida, o que explicaria a hiperinsulinemia e resistência periférica e central à ação da insulina (Bray e York, 1979; Bray, 1991; Bray, 1998; Balbo, Grassioli *et al.*, 2007). O nervo vago, principal nervo parassimpático, possui um importante papel na interação entre os mecanismos centrais e periféricos. No seu trajeto o nervo vago dá origem a vários ramos que inervam a faringe e a laringe, entrando na formação dos plexos viscerais que promovem a inervação autonômica da maioria das vísceras torácicas e abdominais (Guyton e Hall, 2006).

Como vem sendo mostrado através de vários trabalhos experimentais, os modelos de obesidade mais comumente utilizados em laboratórios experimentais são, entre outros, os produzidos por indução de lesões nas células do ARC através de aplicações subcutâneas de monossódio L-glutamato (MSG) durante os primeiros dias de vida do animal ([Olney, 1969](#), [Nascimento Curi et al., 1991](#)), os modelos por indução através de dietas rica em gorduras ([Howard, 2002](#), [Prada et al., 2006](#)) e por uma programação metabólica pós-parto através da superalimentação da prole por reduzir o tamanho normal da ninhada ([Davidowa, Plagemann, 2000](#)). Nosso laboratório vem mostrando, através da medição direta da atividade elétrica do nervo vago, que ratos alimentados com dieta hiperlipídica (ratos-HFD) apresentam elevada atividade parassimpática em jejum (Barella et al. 2012), assim como em outros modelos de obesidade (Scomparin, Gomes *et al.*, 2009). Segundo Balbo *et al.* (2000; 2002) a obesidade de ratos obesos-MSG é parcialmente revertida pela vagotomia bilateral subdiafragmática. Além disso, a resistência à insulina neste modelo é revertida pela vagotomia bilateral subdiafragmática (Balbo, Mathias *et al.*, 2000; Balbo, Bonfleur *et al.*, 2002).

Desse modo considerando a linha de pesquisa do nosso laboratório nos propomos aqui, a oferecer um curso que aborde um pouco a temática envolvendo a etiologia da obesidade e os mecanismos de regulação de secreção de insulina e controle glicêmico, os quais são parâmetros metabólicos classicamente alterados em indivíduos obesos.

## **Objetivo**

Discutir mecanismos fisiopatológicos do desenvolvimento da obesidade envolvidos na programação metabólica e sua relação com a origem e desenvolvimento da obesidade (DOHAD).

## **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 Biologia Celular e Genética. Os protocolos experimentais serão desenvolvidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá.

### 1. *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*

#### 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<sup>®</sup>) 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 (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 2g/Kg de peso corporal do animal. Aos 5, 15, 30 e 45 min serão colhidas amostras de sangue que serão posteriormente dosadas.

### 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<sup>®</sup>, São Paulo/SP, Brasil), utilizando kit comercial (Gold Analisa<sup>®</sup>, 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; NaHCO<sub>3</sub>, 24; KCl, 1,6; MgCl<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O, 1; CaCl<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O, 1; SAB, 15; e pH 7,4] contendo glicose a 5,6 mmol/L, oxigenada (O<sub>2</sub>,95% + CO<sub>2</sub>, 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 (O<sub>2</sub>,95% + CO<sub>2</sub>, 5%). Ao final da incubação o sobrenadante será coletado dos poços e congelado a -20 °C em freezer (Freezer F250, Eletrolux<sup>®</sup>, 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.
- 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 Psycho***59**, 55-92.
- Bray GA (1991). Obesity, a disorder of nutrient partitioning: the MONA LISA hypothesis. *J Nutr***121**, 1146-1162.
- Bray GA & York DA (1979). Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev***59**, 719-809.
- Bray GA & York DA (1998). The MONA LISA hypothesis in the time of leptin. *Recent Prog Horm Res***53**, 95-117.
- Breier BH, Vickers MH, Ikenasio BA, Chan KY & Wong WP (2001). Fetal programming of appetite and obesity. *Mol Cell Endocrinol***185**, 73-79
- Coupe B, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Lefevre F, Mairesse J, Dickes-Coopman A, Silhol M, Tapia-Arancibia L, Lesage J & Vieau D (2009). Perinatal undernutrition modifies cell proliferation and brain-derived neurotrophic factor levels during critical time-windows for hypothalamic and hippocampal development in the male rat. *J Neuroendocrinol***21**, 40-48.
- Davidowa H & Plagemann A (2000). Different responses of ventromedial hypothalamic neurons to leptin in normal and early postnatally overfed rats. *Neurosci Lett***293**, 21-24.
- de Moura EG & Passos MC (2005). Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep***25**, 251-269.

- Fehm HL, Kern W & Peters A (2006). The selfish brain: competition for energy resources. *Prog Brain Res***153**, 129-140.
- Gao Q & Horvath TL (2008). Neuronal control of energy homeostasis. *FEBS Lett***582**, 132-141.
- Gerozissis K (2008). Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies. *Eur J Pharmacol***585**, 38-49.
- Gilon P & Henquin JC (2001). Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev***22**, 565-604.
- Guyton AC & Hall JE (2006). *Textbook of medical physiology*. Elsevier Saunders ; Oxford : Elsevier Science [distributor], Edinburgh.
- Hallal PC, Wells JC, Bertoldi AD, Gazalle FK, Silva MC, Domingues MR, Carret ML, Araujo CL & Gigante DP (2005). A shift in the epidemiology of low body mass index in Brazilian adults. *Eur J Clin Nutr***59**, 1002-1006.
- Hill JO & Peters JC (1998). Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science***280**, 1371-1374.
- Howard BV (2002). Dietary fat as a risk factor for type 2 diabetes. *Lipids and Insulin Resistance: The Role of Fatty Acid Metabolism and Fuel Partitioning***967**, 324-328.
- Janesick A & Blumberg B (2011). Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res C Embryo Today***93**, 34-50.
- Krechowec SO, Vickers M, Gertler A & Breier BH (2006). Prenatal influences on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity. *J Endocrinol***189**, 355-363.
- Leon-Quinto T, Magnan C & Portha B (1998). Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology***139**, 3382-3389.
- Martins PA, Hoffman DJ, Fernandes MT, Nascimento CR, Roberts SB, Sesso R & Sawaya AL (2004). Stunted children gain less lean body mass and more fat mass than their non-stunted counterparts: a prospective study. *Br J Nutr***92**, 819-825.
- Nascimento Curi CM, Marmo MR, Egami M, Ribeiro EB, Andrade IS & Dolnikoff MS (1991). Effect of monosodium glutamate treatment during neonatal development on lipogenesis rate and lipoprotein lipase activity in adult rats. *Biochem Int***24**, 927-935.
- Obici S (2009). Minireview: Molecular targets for obesity therapy in the brain. *Endocrinology***150**, 2512-2517.
- Olney JW (1969). Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science***164**, 719-721.
- Plagemann A (2005). Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. *Physiol Behav***86**, 661-668.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W & Dörner 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 & Dörner G (1992). Lifelong enhanced diabetes susceptibility and obesity after temporary intrahypothalamic hyperinsulinism during brain organization. *Exp Clin Endocrinol***99**, 91-95.

- Prada PO, Pauli JR, Ropelle ER, Zecchin HG, Carvalheira JB, Velloso LA & Saad MJ (2006). Selective modulation of the CAP/Cbl pathway in the adipose tissue of high fat diet treated rats. *FEBS Lett***580**, 4889-4894.
- Reeves PG, Nielsen FH & George C. Fahey J (1993). AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition***123**, 12.
- Rodrigues AL, De Souza EP, Da Silva SV, Rodrigues DS, Nascimento AB, Barja-Fidalgo C & De Freitas MS (2007). Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol***195**, 485-494.
- Sawaya AL, Martins PA, Grillo LP & Florencio TT (2004). Long-term effects of early malnutrition on body weight regulation. *Nutr Rev***62**, S127-133.
- Scomparin DX, Gomes RM, Grassioli S, Rinaldi W, Martins AG, de Oliveira JC, Gravena C & de Freitas Mathias PC (2009). Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. *Endocrine*.
- Siqueira KS, Appolinario JC & Sichieri R (2004). Overweight, obesity, and binge eating in a non-clinical sample of five Brazilian cities. *Obes Res***12**, 1921-1924.
- Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL & Gluckman PD (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab***279**, E83-87.
- Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ & Liu XH (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav***74**, 683-701.
- Yamaguchi N (1992). Sympathoadrenal system in neuroendocrine control of glucose: mechanisms involved in the liver, pancreas, and adrenal gland under hemorrhagic and hypoglycemic stress. *Can J Physiol Pharmacol***70**, 167-206.
- Yoshimatsu H, Egawa M & Bray GA (1993). Sympathetic nerve activity after discrete hypothalamic injections of L-glutamate. *Brain Res***601**, 121-128.

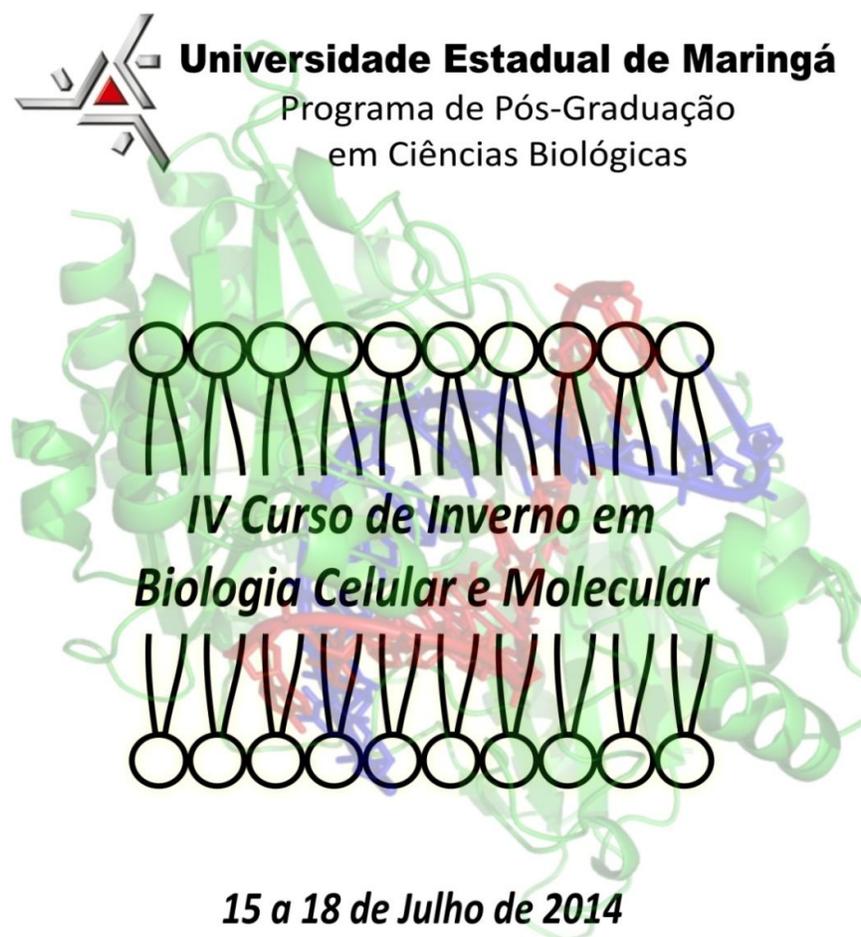
# MINICURSO 15

## MECANISMOS DE AÇÃO DE AGROQUÍMICOS: ENSAIOS LABORATORIAIS.



**Universidade Estadual de Maringá**

Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas



*IV Curso de Inverno em  
Biologia Celular e Molecular*

**15 a 18 de Julho de 2014**

**LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA DE PLANTAS**

**Professor:**

Oswaldo Ferrarese-Filho

**Pós-graduandos:**

Wanderley Dantas dos Santos, Rogério Marchiosi,  
Rogério Barbosa de Lima, Anderson Ricardo  
Soares, Gisele Bubna, Aline Finger, Jennifer  
Munik Bevilaqua, Rodrigo Polimeri Constantin,  
Tiara da Silva Coelho Bortolo, Flávia Carolina  
Moreira Vilar, Gabriela Ellen Barreto,  
Ana Paula Ferro e Rita de Cássia Siqueira

## **1. INTRODUÇÃO**

Herbicidas, em geral, agem como inibidores de enzimas que atuam em vias metabólicas cujos produtos são essenciais para as plantas. As plantas possuem mecanismos naturais para lidar com compostos estranhos (xenobióticos) e podem apresentar tolerância variada a eles. Com o uso contínuo, ocorre uma pressão de seleção que pode originar populações resistentes ao herbicida. Mutações naturais ou induzidas pelos próprios herbicidas podem acelerar este processo na presença de uma pressão de seleção.

### **1.1 Histórico**

As pesquisas para produção de herbicidas datam do início do século XX. Entretanto, o primeiro sucesso comercial só foi obtido durante a segunda guerra mundial, com o desenvolvimento do 2,4-D. Aplicado nas concentrações adequadas, este análogo sintético das auxinas naturais, promove a inibição do crescimento em dicotiledôneas (plantas de folhas largas), permitindo o controle de plantas invasoras em culturas de cereais.

Nos anos 1950, a Atrazina foi lançada e alcançou o grande sucesso que tem ainda hoje. Banido da Europa em 2004, a Atrazina continua sendo um dos herbicidas mais usados no controle de praga de cereais nos EUA e para controle de pragas da cana-de-açúcar na Austrália. No Brasil a Atrazina também é bastante utilizada em culturas como cereais, cana-de-açúcar, banana e sisal. As triazinas são inibidores do fotossistema II, prejudicando a fotossíntese. Como os animais não dispõem de mecanismos fotossintéticos, estes compostos não deveria afetar os animais. No entanto, hoje em dia, sabe-se que a Atrazina se acumula nos lençóis freáticos e pode causar transtornos endocrinológicos em humanos, bem como em outros animais.

O glifosato foi introduzido na década de 1970. Ele é um inibidor da enzima enolpiruvil chiquimato fosfato sintase, uma enzima da rota biossintética dos aminoácidos aromáticos presente em todas as plantas, mas ausente nos animais. Assim, o glifosato é um herbicida não seletivo de baixa toxicidade. Seu grande sucesso advém do desenvolvimento de culturas resistentes ao

herbicida na década de 1990, o que permite a eliminação seletiva de plantas daninhas.

Agindo de modo similar, inibidores da acetolactato sintase impedem as plantas de produzir aminoácidos de cadeia ramificada. Como estes aminoácidos são fundamentais para a síntese de proteínas a inibição de sua síntese leva um grande número de plantas daninhas à morte. Por outro lado, muitas culturas de interesse comercial são eficazes na metabolização destes compostos, daí seu grande sucesso. Parte do sucesso se deve ainda às baixas doses e toxicidade que esta classe de herbicidas apresenta. Entretanto, tem sido demonstrado que a longa permanência destes herbicidas no solo pode levar à fitotoxicidade nas culturas subsequentes. Além disso, os primeiros casos de resistência foram relatados já em 1990, menos de cinco anos após o seu lançamento.

O clomazone foi o primeiro herbicida inibidor da biossíntese de carotenoides. Comercializado desde a década de 1960, os herbicidas desta classe induzem a fotodegradação da clorofila devido à inibição da síntese de carotenoides, que possuem papel fotoprotetor. A isoxaflutola é um pró-herbicida cuja ação ocorre após sua conversão espontânea em diquetonitrila em água, solo ou na própria planta inibindo também a síntese de clorofila.

As cicloexanodionas, também introduzidas na década de 1980 são herbicidas foliares que agem inibindo a acetil-CoA carboxilase, primeira enzima comprometida com síntese de ácidos graxos em plantas. Como estas enzimas são distintas em monocotiledôneas e dicotiledôneas, as cicloexanodionas são herbicidas seletivos com baixa toxicidade para dicotiledôneas.

Em todos os casos, o uso de agrotóxicos tem promovido o surgimento de plantas resistentes. A resistência é causada pela pressão de seleção promovida pelo uso prolongado de agrotóxicos que matam biótipos mais susceptíveis, mas permitem o desenvolvimento de progênies mais tolerantes. Ao longo das gerações, linhagens expostas ao herbicida geram progênies cada vez mais resistentes, até já não poderem mais ser controladas pelo herbicida. Assim, o conhecimento do modo de ação dos herbicidas, bem como dos mecanismos de metabolização e resistência é de grande importância para agrônomos e agricultores, a fim de minimizar estes efeitos indesejáveis.

## 1.2 Principais Mecanismos de Ação

Os herbicidas inibidores da síntese de aminoácidos estão entre os mais importantes herbicidas atualmente comercializados, devido sua alta eficiência e baixa toxicidade, tendo boa seletividade em culturas de interesse econômico. Os herbicidas que atuam na inibição de aminoácidos aromáticos e de aminoácidos de cadeia ramificada atingem a membrana celular e o crescimento das plantas. A denominação “inibidores da síntese de aminoácidos” é usada para se referir a um conjunto de herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS), inibidores da enolpiruvil chiquimato fosfato sintase (EPSPS) e inibidores da glutamina sintetase (GS).

Inibidores da ACC são também conhecidos como graminicidas, pois controlam principalmente as plantas gramíneas, perenes e anuais, em pós-emergência. O mecanismo de ação apresentado é a inibição da enzima ACC, impedindo a produção de lipídios nas plantas suscetíveis. Com isso é interrompida a formação de novas membranas celulares e o crescimento da planta é paralisado.

Uma terceira classe de herbicidas está relacionada com a inibição da fotossíntese. Os inibidores dos fotossistemas I e II retiram elétrons da cadeia de transporte de elétrons impedindo a síntese de NADPH e ATP (inibidores da FSII). Além disso, promovem um aumento na produção de radicais altamente tóxicos para a planta. O caroteno é um pigmento responsável, dentre outras funções, pela proteção da clorofila da foto-oxidação. Plantas tratadas com herbicidas que inibem a síntese de carotenóides apresentam branqueamento dos tecidos fotossintéticos devido à destruição parcial da clorofila, desprotegida. O acúmulo de radicais livres também é marcante nestas plantas.

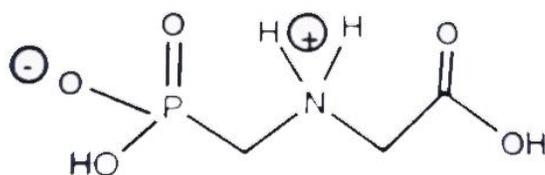
A protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) é uma enzima do cloroplasto que atua oxidando o protoporfirinogênio para produzir a protoporfirina IX precursora da clorofila e de grupamentos heme. Herbicidas como os inibidores da PROTOX apresentam baixo e não crescente número de plantas daninhas resistentes o que pode estar relacionado ao modo de ação deste herbicida. Os herbicidas inibidores da enzima PROTOX são importantes componentes no manejo de plantas daninhas em diversas culturas agrícolas como soja, feijão,

cana-de-açúcar, algodão, café, arroz e até mesmo nos processos de reflorestamento (Wakabayashi e Boger.2002; Jablonkai, 2011)

### 1.3. Identificando o mecanismo de ação do glifosato através do acúmulo de chiquimato

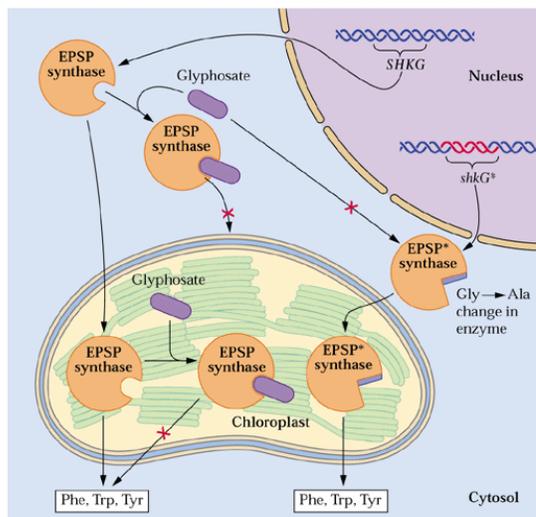
A **via do chiquimato** é responsável pela biossíntese de muitos ácidos fenólicos, os quais desempenham inúmeras atividades bioquímicas em plantas, como por exemplo, ações antioxidantes, antifúngicas, mecanismos de defesa, alelopatia e resistência. Sob condições normais de crescimento das plantas, 20% do carbono fixado flui através desta via metabólica (Diaz, Bernal *et al.*, 2001). A via consiste de sete reações enzimáticas que se iniciam com a condensação de dois derivados de carboidratos, fosfoenolpiruvato (PEP) da glicólise e eritrose 4-fosfato (E4P) da via das pentoses fosfato, culminando com a síntese de corismato (Figura 3). Este é o precursor comum na biossíntese de vários compostos aromáticos, incluindo os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina (Herrmann e Weaver, 1999), os quais são utilizados na síntese de proteínas ou convertidos, pelo metabolismo de fenilpropanoides, em diferentes produtos secundários.

O glifosato [*N*-(fosfometil) glicina] (Figura 1) é um herbicida pós-emergente de amplo espectro que inibe o crescimento de plantas daninhas e de espécies cultivadas. Ele interfere na biossíntese de aminoácidos aromáticos através da inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSPS), uma enzima da via do chiquimato.



**Figura 1.** Estrutura química do glifosato [*N*-(fosfometil) glicina].

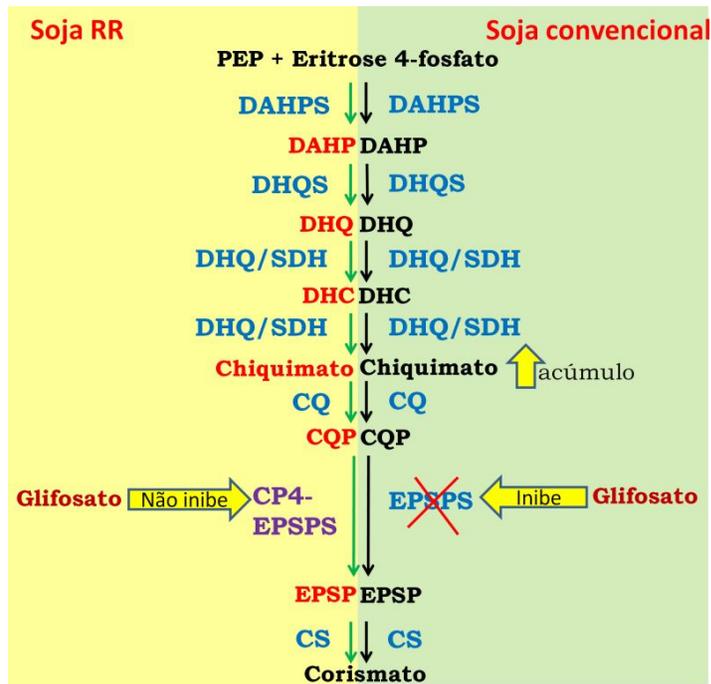
A soja RR (Roundup<sup>®</sup> Ready) é caracterizada pela incorporação do gene CP4-EPSPS, clonado de *Agrobacterium sp*, linhagem CP4, em seu genoma (Padgett, Kolacz *et al.*, 1995; Franz, Mao *et al.*, 1997). Assim, a soja transgênica codifica uma variante da EPSPS que possui baixa afinidade pelo glifosato, conferindo à planta resistência a este herbicida, isto é, a atividade da enzima se mantém independente da presença do glifosato (Figura 2) (Shah, Horsch *et al.*, 1986; Padgett, Kolacz *et al.*, 1995; Harrison, Bailey *et al.*, 1996).



**Figura 2.** Comparação entre planta convencional e tolerante ao glifosato, quanto à conformação e atividade da EPSPS e síntese de aminoácidos, na presença ou ausência do herbicida glifosato (BUCHANAN *et al.*, 2000).

Desde 1996, pesquisadores do **Laboratório de Bioquímica de Plantas (BIOPLAN)**, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), vêm se dedicando ao estudo da **via do chiquimato**. Dentre os principais trabalhos relacionados a esta via metabólica destacamos o desenvolvimento de um método de diferenciação entre soja convencional e soja transgênica resistente ao glifosato, para o qual patente foi requerida em 2008 (PI08005214; INPI). Em ambos os estudos, foram avaliados os efeitos do glifosato sobre o teor de chiquimato de raízes e folhas de soja convencional e transgênica. Os resultados indicaram um acúmulo de chiquimato nas plantas convencionais expostas ao herbicida, mas não nas plantas transgênicas. Como dito anteriormente, a soja RR possui uma variante da enzima EPSPS e, portanto, a via pode operar normalmente mesmo na presença do herbicida. Em plantas de soja convencionais a inibição da

EPSPS pelo glifosato conduz ao acúmulo dos intermediários metabólitos localizados acima do ponto de inibição na via, dentre os quais o chiquimato (Figura 3).



**Figura 3.** Via do chiquimato em cultivares de soja convencional e transgênica resistente ao glifosato. Como mostrado, a inibição da EPSPS de soja convencional leva ao acúmulo de chiquimato nessas plantas. A soja RR expressa uma variante da enzima, CP4-EPSPS, que é insensível ao herbicida, portanto, o acúmulo de chiquimato não é observado nessas plantas.

DAHPS – 3-desoxi-D-arabinoheptulose 3-fosfato sintase

DHQS – 3-desidroquinato sintase

DHQ/SDH – 3-desidroquinato desidratase/chiquimato desidrogenase

CQ- chiquimato quinase

EPSPS – 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase

CS – corismato sintase

## 2. Metodologia

### 2.1. Procedimentos gerais

*Germinação após embebição de sementes em glifosato* - Sementes de soja (cultivar convencional BRS-232 e transgênica CD-215RR) serão utilizadas para a realização dos experimentos. As sementes (num total de 400) serão imersas em béquer contendo solução de glifosato 0.5 mM. Em seguida as sementes serão transferidas para papel Germitest CEL-060 e postas a germinar em câmara escura, a 25°C. Serão confeccionados 8 rolos, de cada variedade, contendo 50 sementes cada um. Após 3 dias as raízes serão separadas, pesadas, e sofrerão extrações para quantificação de chiquimato.

*Cultivo hidropônico em solução nutritiva contendo glifosato* - Sementes de soja (cultivar convencional BRS-232 e transgênica CD-215RR) serão utilizadas para a realização dos experimentos. As sementes serão previamente desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio durante 3 min e, a seguir, lavadas com água deionizada. Após este procedimento, as sementes serão depositadas, separadamente, entre duas folhas de papel *Germitest* CEL-060 umedecidas, as quais serão enroladas e acondicionadas em béqueres contendo um pequeno filme de água para manutenção da umidade. Os rolos serão acondicionados em câmara escura (Tecnal TE 400, Brasil) a 25°C. Após 3 dias de germinação, plântulas uniformes serão separadas para a montagem do sistema experimental. Cada sistema experimental constará de um recipiente de vidro, medindo 15 cm de altura e 9 cm de diâmetro, onde será adicionada a solução nutritiva. Dentro dele, encaixa-se uma placa de acrílico com 25 perfurações de 5 mm, que servirá como suporte para as plântulas. Essa placa também possui um orifício por onde passará uma mangueira sorológica, ligada a um compressor capaz de permitir aeração contínua da solução nutritiva.

O sistema hidropônico será mantido em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas, a  $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com temperatura de 25° C e umidade de 80%. Após 24 horas de incubação as raízes serão separadas, pesadas, e sofrerão extrações para quantificação de chiquimato.

## **2.2. Extração do chiquimato**

Os tecidos vegetais (folhas e raízes) obtidos nos diferentes experimentos (sistema hidropônico e embebição) serão macerados em gral com HCl 0,25 M (1:3 peso/volume). As amostras serão centrifugadas a 1200g por 10 minutos e o sobrenadante separado para as análises.

## **2.2. Quantificação cromatográfica de chiquimato**

As amostras extraídas dos tecidos vegetais das plântulas de soja serão analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras serão diluídas em fase móvel, filtradas por meio de seringa adaptada a um filtro com membrana de difluoreto de polivinilideno, de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, USA) e injetada, com auxílio de uma seringa Microliter (Hamilton Co, USA), em cromatógrafo (Shimadzu, Japão), composto de bomba de alta pressão (LC-10AD), injetor manual (Rheodine), detector UV-Vis (SPD-10A), módulo de comunicação (CBM-101) e uma estação de trabalho (Class-CR10) instalada num computador Pentium 166 Mhz. Uma coluna de fase reversa, Shimpack GLC-ODS(M), de comprimento 150 x 4,6 mm, com partículas de 5  $\mu\text{m}$ , será utilizada a temperatura ambiente, acoplada com o mesmo tipo de pré-coluna (10 x 4,6mm) pré-lavada com metanol P.A. A fase móvel será bombeada sob fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Picos com seus respectivos tempos de retenção serão comparados aos picos de padrões de chiquimato injetados e analisados, em condição isocrática, a 220 nm. Uma curva padrão baseada nas áreas dos picos já foi efetuada usando conhecidas concentrações (2 a 18  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de chiquimato. Essa curva padrão será utilizada para calcular a concentração de chiquimato nas amostras.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 2000.

DIAZ, J. et al. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. **Plant Science**, v. 161, p. 179-188, 2001.

FRANZ, J. E.; MAO, M. K.; SIKORSKI, J. A. **Glyphosate's molecular mode of action**. Glyphosate. A unique global herbicide: American Chemical Society. 189: 521-615 p. 1997.

HARRISON, L. A. et al. The expressed protein in synthase in glyphosate-tolerant soybeans, 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase from *Agrobacterium* sp. Strain CP4, is rapidly digested and is not toxic to mice upon acute administration. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 756-761, 1996.

HERRMANN, K. M.; WEAVER, L. M. The Shikimate Pathway. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 473-503, 1999.

JABLONKAI, I. Molecular mechanism of action of herbicides. In: HASANEEN, M. N. (Ed.). **Herbicides - Mechanisms and Mode of Action**. Rijeka, Croatia: Intech, 2011. p.204.

PADGETTE, S. R. et al. Development, Identification, and Characterization of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line. **Crop Science**, v. 35, n. 5, p. 1451-1461, 1995.

SHAH, D. M. et al. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. **Science**, v. 233, n. 4762, p. 478-481, 1986.

WAKABAYASHI, K.; BOGER, P. Target sites for herbicides: entering the 21st century. **Pest Manag Sci**, v. 58, n. 11, p. 1149-54, Nov 2002.