

**RESISTÊNCIA DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DO CARRAPATO
Rhipicephalus (Boophilus) microplus, LINHAGEM BME26, AO
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E SUA CORRELAÇÃO COM O
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS**

BÁRBARA PITTA DELLA NOCE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO – 2013**

**RESISTÊNCIA DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DO CARRAPATO
Rhipicephalus (Boophilus) microplus, LINHAGEM BME26, AO
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E SUA CORRELAÇÃO COM O
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS**

BÁRBARA PITTA DELLA NOCE

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia.”

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO – 2013

**RESISTÊNCIA DAS CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DO CARRAPATO
Rhipicephalus (Boophilus) microplus, LINHAGEM BME26, AO
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E SUA CORRELAÇÃO COM O
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS**

BÁRBARA PITTA DELLA NOCE

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia.”

Defendida em 15 de Julho de 2013.

Comissão Examinadora:

Membro interno

Dr. Arnaldo Rocha Façanha – LBCT / CBB / UENF

Membro externo

Dr. José Roberto da Silva – NUPEM / UFRJ-Macaé

Membro externo

Dr. Eldo Campos – NUPEM / UFRJ-Macaé

Orientador

Dr. Carlos Jorge Logullo de Oliveira – LQFPP / CBB / UENF

Revisor

Dr. Leonardo Araujo de Abreu – Pesquisador colaborador – UFRJ- Macaé

“As pessoas queixam-se da infidelidade da ciência, do modo como ela anuncia como lei hoje o que a geração seguinte identifica como erro e substitui por uma nova lei cuja validade aceita não perdura por mais tempo. Mas isso é injusto e, em parte, inverídico. As transformações da opinião científica são desenvolvimentos, progressos, e não revoluções.

(...)

Não, nossa ciência não é uma ilusão. Ilusão seria imaginar que aquilo que a ciência não nos pode dar, podemos conseguir em outro lugar.”

(Sigmund Freud, no livro O futuro de uma ilusão, 1927)

Dedicatória

*À minha mãe Fátima, mulher forte, polivalente, lutadora e vencedora.
Que procura sempre me passar seus ensinamentos sobre a vida.
Ao Peter, por ser um bravo viking e ao mesmo tempo paterno,
família e um sábio homem, importante para minha formação.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador por ter acreditado na proposta metabólica deste trabalho desde o início. Por me orientar até mesmo sem eu perceber, por maneiras muitas vezes não compreendidas, e por acolher a todos seus alunos como filhos;

Agradecimento especial e com muito carinho a todos os amigos do Lab, cada um a sua maneira, contribuiu de diversas formas para um convívio de muita colaboração, seja nas discussões no journal nosso de cada semana, seja no convívio social de ajuda e compreensão, seja nos lanches, diversões, brincadeiras e churrascos comemorativos onde muitas vezes nos reunimos. Amigos como Ana, Camila, Christiano, Claudinha, Daniela, Dani, Drika e Mauricio Falcão, Jhenifer, Jorge, Josias, Leo, Luan, Mariana, Mauricio Colombiano, Marcelle, Marilena, Newton, Niltinho, Renato, Yolanda...

A prof. Gabi pelas discussões para melhorias do trabalho;

Aos profs. Ita e Glória pela ajuda na obtenção das sequências de bancos de dados particulares;

Aos membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite para examinarem esta tese;

Agradeço também a todas as coisas e fatos existentes no universo.

Obrigada, Obrigada, Muito Obrigada!

SUMÁRIO

Resumo.....	XIV
Abstract	XVI
1- Introdução	17
1.1- O Carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	18
1.2- Embriogênese do carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	20
1.3- Células BME26.....	23
1.4- Metabolismo Energético	25
1.5- Estresse Oxidativo e o peróxido de hidrogênio	27
1.6- Mecanismos Antioxidantes	30
2- Objetivos	32
2.1- Objetivo Geral	33
2.2- Objetivos Específicos	33
3- Materiais e Métodos.....	34
3.1- Preparo do meio Leibovitz-15.....	35
3.2- Manutenção da cultura de células BME26.....	35
3.3- Ensaio de viabilidade das células BME26	35
3.3.1- Método colorimétrico quantitativo por MTT	35
3.3.2- Análise da integridade membranar	36
3.4- Determinação da produção de ROS.....	36
3.5- Preparo do homogenato de células BME26	37
3.6- Atividade da catalase	37
3.7- Consumo de oxigênio	38
3.8- Transcrição relativa do gene de catalase e dos genes do metabolismo de carboidratos.....	38
4- Resultados	40
4.1- Viabilidade das células BME26 frente a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.....	41
4.2- Análise de integridade membranar das células BME26 incubadas com peróxido de hidrogênio.....	42
4.3- Glutaciona Reduzida não afeta a interação entre as células BME26 e o peróxido de hidrogênio no meio L-15 completo	44

4.4- Diminuição da geração de ROS nas células BME26 ao longo do tempo de incubação após tratamento com peróxido de hidrogênio.....	45
4.5- Alteração da taxa de respiração das células BME26 frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio.....	49
4.6- Catalase não altera sua atividade em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio em células BME26, porém possui resposta a nível transcricional.....	50
4.7- Genes da via glicolítica foram avaliados frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio nas células BME26.....	51
4.8- Avaliação da expressão do gene da gliconeogênese (PEPCK) frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio nas células BME26.....	53
4.9- Avaliação da expressão do gene da via das pentoses fosfato (G6PDH) frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio nas células BME26.....	54
5- Discussão.....	55
6- Conclusões.....	62
7- Referências.....	65
Anexo 1.....	73
Anexo 2.....	74
Anexo 3.....	76

Índice de figuras:

Fig. 1: O carrapato <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> , parasitando seu hospedeiro bovino.....	19
Fig. 2: O ciclo biológico do <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	19
Fig. 3: Morfologia dos embriões de <i>R. microplus</i> nas diferentes etapas do desenvolvimento da embriogênese.....	21
Fig. 4: Características das células BME26.....	24
Fig. 5: Geração de ROS por transferência de energia.....	27
Fig. 6: Sensibilidade das células AH927 ao estresse oxidativo, induzido pelo peróxido de hidrogênio.....	28
Fig. 7: Viabilidade das células BME26 frente a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.....	41
Fig. 8: Análise de integridade membranar nas células BME26 incubadas com H ₂ O ₂ 2,2mM por 24 horas.....	43
Fig. 9: Efeito da glutatona Reduzida na interação entre células BME26 e H ₂ O ₂ no meio L-15 completo.....	44
Fig. 10: Avaliação de geração de ROS nas células BME26 após tratamento com H ₂ O ₂ por 2 horas.....	46
Fig. 11: Avaliação de geração de ROS nas células BME26 após tratamento com H ₂ O ₂ por 12 horas.....	47
Fig. 12: Avaliação de geração de ROS nas células BME26 após tratamento com H ₂ O ₂ por 24 horas.....	48
Fig. 13: Taxa de consumo de oxigênio nas células BME26 frente ao tratamento com 4,4 mM de H ₂ O ₂ em diferentes tempos de incubação.....	49
Fig. 14: Atividade específica de catalase nas células BME26 com 2,2 mM de H ₂ O ₂ em diferentes tempos de incubação.....	50
Fig. 15: Transcrição relativa da catalase frente ao tratamento com H ₂ O ₂ nas células BME26.....	51

Fig.16: Transcrição relativa do gene da hexoquinase frente ao tratamento com H ₂ O ₂ nas células BME26.....	52
Fig.17: Transcrição relativa do gene da Piruvato kinase frente ao tratamento com H ₂ O ₂ nas células BME26.....	52
Fig.18: Transcrição relativa do gene da PEPCK frente ao tratamento com H ₂ O ₂ nas células BME26.....	53
Fig.19: Transcrição relativa do gene da G6PDH frente ao tratamento com H ₂ O ₂ nas células BME26.....	54
Tabela 1: Genes obtidos no GenBank para BLAST no transcriptoma de <i>R. microplus</i>	39

Abreviaturas

ATP – Adenosina Trifosfato

DHE – Dihidroetideo

DL₅₀ – Dose letal a 50%

G6PDH – Glicose-6 fosfato desidrogenase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HK – Hexoquinase

PEPCK – Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PK – Piruvato Kinase

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês Reactive Oxygen Species

Resumo

As células embrionárias do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, linhagem BME26, foram isoladas há aproximadamente 30 anos, e se caracterizam por possuírem adesão ao substrato, morfologia heterogênea, um grande número de vesículas de diferentes graus de acidificação com conteúdo lipídico, além de inclusões de glicogênio e numerosas mitocôndrias dispersas no citoplasma. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um produto químico instável descrito como um poderoso agente oxidante, conhecido como uma das formas reativas de oxigênio (ROS). Essas espécies são produzidas durante o processo de respiração celular e, por sua natureza química podem reagir com macromoléculas e causar danos aos componentes e estruturas celulares. Esses danos podem levar à morte celular quando há um desequilíbrio entre os reagentes oxidantes e os mecanismos de detoxificação celular. Desta forma, existem mecanismos de proteção para evitar a destruição celular mantendo concentrações de superóxido e peróxido de hidrogênio sob controle. Atualmente admite-se que exista uma relação entre a regulação do estresse oxidativo e o metabolismo energético. A modulação de componentes da via glicolítica por H_2O_2 vem sendo amplamente estudada. O potencial redox desempenha um papel importante na sobrevivência celular, sendo o NADPH o principal redutor intracelular, produzido principalmente na via das pentoses fosfato, que é regulada pela G6PDH. Observações do grupo indicavam que as células BME26 quando tratadas com H_2O_2 2,2 mM não apresentavam queda da viabilidade ou alterações morfológicas. Essa aparente resistência ao H_2O_2 é o objeto de estudo desta dissertação. As células BME26 resistem 30 vezes mais ao H_2O_2 do que outras células de linhagens de mamífero, e esse efeito parece independente de constituintes do meio de cultivo como a glutatona reduzida. As células BME26 parecem ter um mecanismo de eliminação do H_2O_2 , pois a marcação de ROS, pela sonda DHE, diminui ao longo do tempo. Foi visto que diferentes tratamentos com H_2O_2 não alteraram a atividade de catalase, mas são suficientes para aumentarem sua transcrição gênica. O consumo de O_2 também foi alterado após o tratamento com peróxido. Neste trabalho observou-se também que as células BME26 são capazes de ativar genes do metabolismo em resposta ao tratamento com H_2O_2 . A transcrição dos genes de hexoquinase aumenta enquanto que a transcrição de piruvato quinase diminui frente ao tratamento com H_2O_2 , que não afeta a transcrição

de PEPCK. Por outro lado, a transcrição do gene de G6PDH tem um grande aumento, o que pode ser relacionado a um aumento do potencial redutor associado ao desafio pelo H_2O_2 . Este estudo tem ajudado a esclarecer como a resistência ao H_2O_2 pode contribuir para a fisiologia e/ou o metabolismo das células BME26 e futuramente pode ser estendido para compreensão de alguns mecanismos no próprio carrapato.

Abstract

Rhipicephalus (Boophilus) microplus embryo cell line BME26 was first isolated approximately 30 years ago. BME26 cells are mildly adherent to the substrate, display a heterogeneous morphology, large number of vesicles with different acidification degrees, glycogen inclusions and numerous mitochondria in the cytoplasm. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is an unstable chemical described as a powerful oxidizing agent, known as one of the reactive forms of oxygen (ROS). These species are produced during the process of cellular respiration, can react with macromolecules and cause damage to cellular components and structures. Imbalance between ROS produced and antioxidant mechanisms can lead to cell death. The relationship between the oxidative stress regulation and energy metabolism has been currently accepted. Modulation of glycolytic pathway components by H_2O_2 has been widely investigated. The redox potential plays an important role in cell survival. NADPH produced mainly in the pentose phosphate pathway, is regulated by G6PDH. In this study, it was shown that BME26 cells treated with 2,2 mM H_2O_2 did not show a decrease in viability nor morphological changes. Such resistance to H_2O_2 is the aim of study for this dissertation. BME26 cells were 30 times more resistant to H_2O_2 than other mammalian cell lines. This effect is independent of medium constituents, such as reduced glutathione. BME26 cells appear to have a mechanism of elimination of H_2O_2 , for the dyeing of ROS with a fluorescent probe diminished after peroxide exposure. It was seen that different treatments with H_2O_2 did not alter the activity of catalase, but were sufficient to increase its gene transcription. The O_2 consumption was also altered after the treatment with peroxide. In this work it was also observed that cells are able to activate BME26 metabolism genes in response to treatment with H_2O_2 . The hexokinase gene transcription increased as the pyruvate kinase transcription decreased towards treatment with H_2O_2 . Under the same conditions, the treatments did not affect PEPCK transcription. On the other hand, G6PDH gene transcription was greatly increased, which may be related to an increase in the reducing potential challenge associated with H_2O_2 . This study may help to elucidate how the resistance to H_2O_2 may contribute to the physiology and / or cell metabolism and eventually BME26 can be extended to understand some of the mechanisms in other tick life stages.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1- O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Carrapatos são ectoparasitos hematófagos pertencentes ao filo Artropoda, sub-filo Chelicerata, sub-classe Acarina da classe Arachnida, ordem Acari, descritos em três Famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (Keirans, 1992; Keirans e Robbins, 1999). São encontrados em quase todas as regiões do mundo, com predominância em áreas tropicais e subtropicais. Possuem grande importância médico-veterinária por transmitirem bactérias, vírus, fungos e protozoários, os quais usualmente resultam em infecções letais (Jongejan e Uilenberg, 2004).

Os prejuízos econômicos causados por carrapatos, apenas no setor agropecuário, incluem perdas na produção de leite e carne (Sutherst et al., 1983), depreciação do valor por danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação (Seifert et al., 1968), transmissão de doenças das quais o carrapato é vetor (Umemiya et al., 2008), custos relacionados à mão-de-obra, despesas com instalações, compra dos carrapaticidas e de equipamentos de suporte para aplicação dos mesmos nos rebanhos (Corson et al., 2004).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pertence à família dos Ixodídeos, caracterizada por um rápido e único ingurgitamento das fêmeas durante seu ciclo de vida, que resulta na postura de um grande número de ovos (Flechtmann, 1977).

O carrapato *R. microplus* (Fig. 1) é originado da Ásia e infesta preferencialmente bovinos, sendo responsável por grandes perdas econômicas para a pecuária de regiões tropicais e subtropicais. Sua incidência é maior nos grandes rebanhos da América, África, Ásia e Austrália, sendo considerado o carrapato de maior importância econômica nos rebanhos da América do Sul (Gonzáles, 1995; Nari, 1995). Segundo estimativas realizadas no ano de 2006, os prejuízos econômicos causados por esta espécie no Brasil atingiram a ordem de dois bilhões de reais (Embrapa, 2005).



Fig. 1: O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, parasitando seu hospedeiro bovino.

No seu ciclo de vida o carrapato *R. microplus* apresenta duas etapas distintas: uma fase parasitária durante um período médio de 22 dias sobre um único hospedeiro e uma fase de vida livre que ocorre no solo podendo durar de dois a três meses, dependendo principalmente das condições climáticas existentes (Fig. 2) (Gonzales et al., 1974).

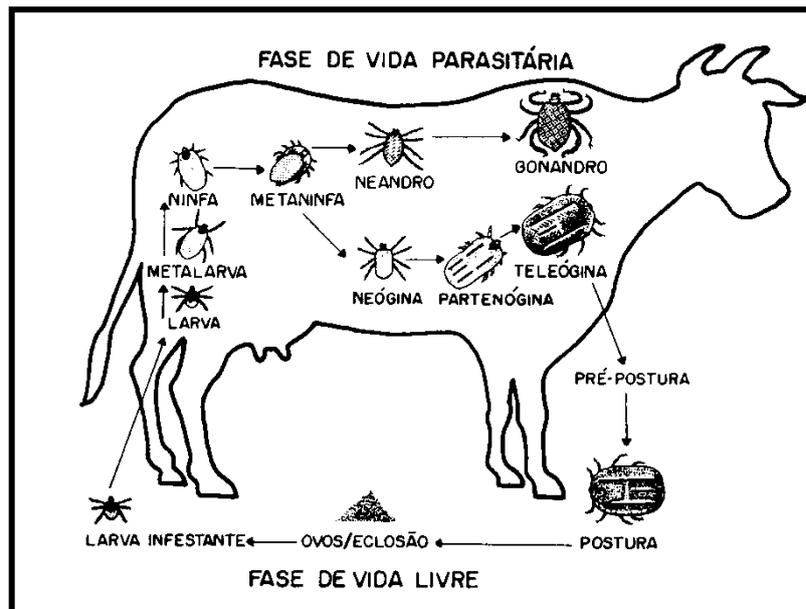


Fig. 2: O ciclo biológico do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Desenvolvimento dividido em duas fases: fase de vida livre e fase parasitária, em seu hospedeiro bovino (González et al., 1974).

A fase não parasitária (fase de vida livre) compreende os estágios de fêmea adulta (teleógina), ovo e larva infestante. A fêmea adulta desprende-se do bovino para procurar um local no solo para efetuar a postura dos ovos. Em condições adequadas de temperatura (26-28°C) e umidade (~80%) a postura se inicia no terceiro dia após a queda. Após a ovoposição, que é de aproximadamente 3000 ovos, a fêmea morre. Os ovos começam a eclodir 21 dias após a postura. As larvas passam por um período de maturação de aproximadamente uma semana para estarem aptas a fixarem-se no hospedeiro e continuarem o desenvolvimento (Gonzales et al., 1974).

Na fase parasitária, o carrapato apresenta três variações morfológicas distintas: larva, ninfa e adulto. A larva alimenta-se e inicia o processo de desenvolvimento e crescimento tegumentário. Em torno do sexto dia a larva vira ninfa adquirindo uma nova estrutura com mais um par de patas, ficando agora com 4 pares, e uma fileira de dentição do hipostômio entre outras alterações. Esta fase dura em média dois a quatro dias, até que ao final do processo surja o indivíduo adulto, sexualmente diferenciado, que acontece em torno do décimo segundo dia. Em torno do décimo sétimo dia os machos já estão aptos à cópula podendo fecundar as fêmeas. Após a fecundação, as fêmeas, em um período de três dias, passam a partenógena (parcialmente ingurgitada) e em mais dois dias, a teleógina (ingurgitamento máximo) (Gonzales et al., 1974). As fêmeas apresentam um tamanho cerca de 10 vezes superior ao dos machos. Aos 22 dias, a maioria das fêmeas cai ao solo. Os machos podem permanecer no bovino por mais de 38 dias fecundando inúmeras fêmeas (Gonzales et al., 1974).

1.2- Embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Campos e colaboradores em 2006 demonstraram algumas etapas da embriogênese do carrapato *R. microplus*. O processo ocorre em média de 21 dias, desde a postura dos ovos até a eclosão, em condições controladas de temperatura e umidade. O desenvolvimento dos embriões do carrapato bovino se dá de forma semelhante ao da *Drosophila melanogaster*, onde após a fecundação ocorre a formação do blastoderma sincicial, na qual muitos núcleos estão presentes em um citoplasma comum (Fig. 3B) (Wolpert, et al., 2000). A formação do blastoderma

sincicial ocorre no quarto dia de desenvolvimento. No primeiro dia há apenas um núcleo (Fig. 3A). Posteriormente, a membrana plasmática cresce a partir da superfície envolvendo cada núcleo e formando células, o que dá origem ao blastoderma celular, que foi observado no sexto dia de desenvolvimento (Fig. 3 C). A partir do sétimo dia, o embrião apresenta-se completamente segmentado (Fig. 3 D) (Campos et al., 2006).

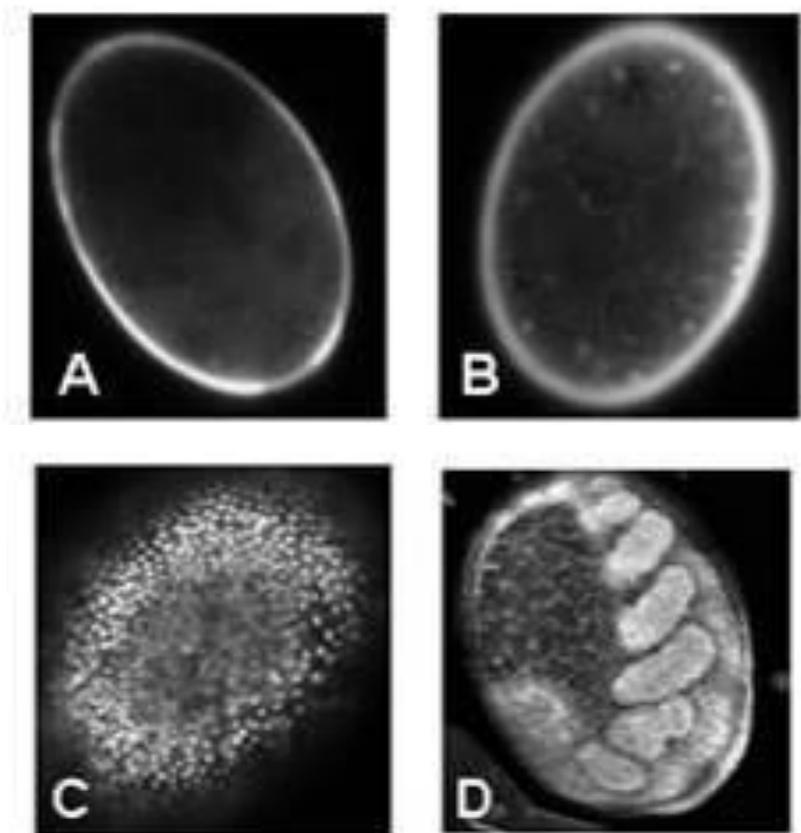


Fig. 3: Morfologia dos embriões de *R. microplus* nas diferentes etapas do desenvolvimento da embriogênese. A- 1º dia de desenvolvimento, B- 4º dia de desenvolvimento (blastoderma sincicial), C- 6º dia de desenvolvimento (blastoderma celular), D- 7º dia de desenvolvimento (embrião segmentado) (modificado de Campos et al., 2006).

Durante a embriogênese do carrapato *R. microplus* foram observadas diversas mudanças metabólicas associadas ao desenvolvimento do embrião. Por exemplo, a formação do blastoderma celular marca uma mudança metabólica na embriogênese do carrapato, sendo entre o sexto e o sétimo dia de desenvolvimento (Fig. 3 C e D, respectivamente), onde conteúdos de glicose e glicogênio são mobilizados e ressintetizados. Também foi observado que no início da embriogênese ocorre um aumento considerável na atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase,

atingindo um pico no quinto dia após a oviposição, mostrando o direcionamento da glicose-6-fosfato formado pela hexoquinase para a via das pentoses fosfato. Foi mostrado que tais alterações metabólicas estão relacionadas com o momento de desenvolvimento embrionário, pois durante o quinto e sexto dia ocorre a formação de núcleos onde é necessário o fornecimento de ribose-5-fosfato para síntese nucleotídeos, além disso, a disponibilidade de NADPH, produzido também pela via das pentoses fosfato, pode ser utilizada no sexto dia para a biossíntese de fosfolípidios, necessários para a celularização do blastoderma. Após estes momentos, no sétimo dia de desenvolvimento, há uma redução drástica da atividade de G6PDH, permanecendo em níveis baixos até o final da embriogênese. (Moraes et al., 2007; Campos et al., 2006).

Como o embrião em desenvolvimento requer uma alta demanda energética, a mobilização coordenada das principais fontes de energia e o aumento do consumo de oxigênio são bem definidas em função do crescimento e das mudanças morfogenéticas (Campos et al., 2006), principalmente em indivíduos que são desenvolvidos em um sistema fechado quase autossuficiente (ovos cleidóicos) (Rombough, 2011). Moraes e colaboradores (2007) mostraram que a mobilização seletiva de reservas do ovo de carrapato representa uma estratégia metabólica adotada por esses parasitas para atender a sua demanda biossintética durante a embriogênese. Tendo como principal fonte de energia os carboidratos, que é mobilizado durante todo o processo para a rápida segmentação do embrião em diferentes modelos de artrópodes.

Desse modo, nosso grupo de pesquisa tem focado na caracterização bioquímica e molecular de enzimas envolvidas direta ou indiretamente na embriogênese do carrapato *R. microplus* como possíveis alvos para interferência de sua proliferação. Nesse sentido, as células embrionárias de *R. microplus* (BME26) surgem como um bom modelo para estudos ainda não possíveis no carrapato, principalmente pelo fato do ciclo de vida do carrapato ectoparasita *R. microplus* possuir uma fase obrigatória em seu hospedeiro bovino.

1.3- Células BME26

O cultivo de células de carrapatos alcançou o estabelecimento da sua primeira linhagem há mais de três décadas (Varma et al., 1975) e, hoje, as linhagens estabelecidas são valiosas ferramentas, pois fornecem modelos de estudo de interações carrapato-patógeno em nível celular e molecular (Bell-Sakyi et al., 2007). Aproximadamente 50 linhagens foram estabelecidas nos últimos 30 anos a partir de 13 espécies de carrapatos duros (Ixodídeos). Mais recentemente foram estabelecidas linhagens de carrapato moles (Argasídeos) (Mattila et al., 2007).

A cultura primária da linhagem BME26 foi desenvolvida em Agosto de 1981 usando uma massa de ovos de até 17 dias de desenvolvimento de uma única fêmea ingurgitada (Holman et al., 1980). Como essa linhagem teve origem em fragmentos de tecidos embrionários, a origem tecidual e o nível de diferenciação dessa linhagem ainda não são conhecidos. Esteves e colaboradores (2008) confirmaram a origem da linhagem de células BME26 através do sequenciamento parcial do gene mitocondrial 16S. A seqüência desse gene é 100% idêntica a seqüência do gene de *R. microplus*, mostrando que essa linhagem realmente foi derivada dessa espécie. Recentemente, esse mesmo grupo realizou a propagação *in vitro* de *Anaplasma marginale* em células BME26 (Esteves et al., 2009). O carrapato *R. microplus* é o principal vetor de *A. marginale*, o patógeno causador da borreliose em regiões tropicais e subtropicais (de la Fuente et al., 2007).

A linhagem BME26 se adere firmemente ao substrato e é morfológicamente heterogênea, apresentando núcleos de diferentes tamanhos (Fig. 4 A, núcleo marcado com DAPI, seta amarela). Culturas iniciais, pouco confluentes, possuem a aparência de fibroblastos. À medida que aumenta a confluência as células vão se tornando arredondadas, maiores e com uma grande quantidade de vesículas que ficam dispersas no citoplasma e apresentam diferentes graus de acidificação (Fig. 4 C, vesículas marcadas com laranja de acridina, seta azul). O número de vesículas varia de célula para célula e elas contêm uma grande quantidade de lipídeos. Essas células também possuem uma grande quantidade de mitocôndrias (Fig. 4 B, mitocôndria marcada com rodamina, seta vermelha) e inclusões de glicogênio disperso no citoplasma (Fig. 4 D, marcado por asterisco preto) (Esteves et al., 2008).

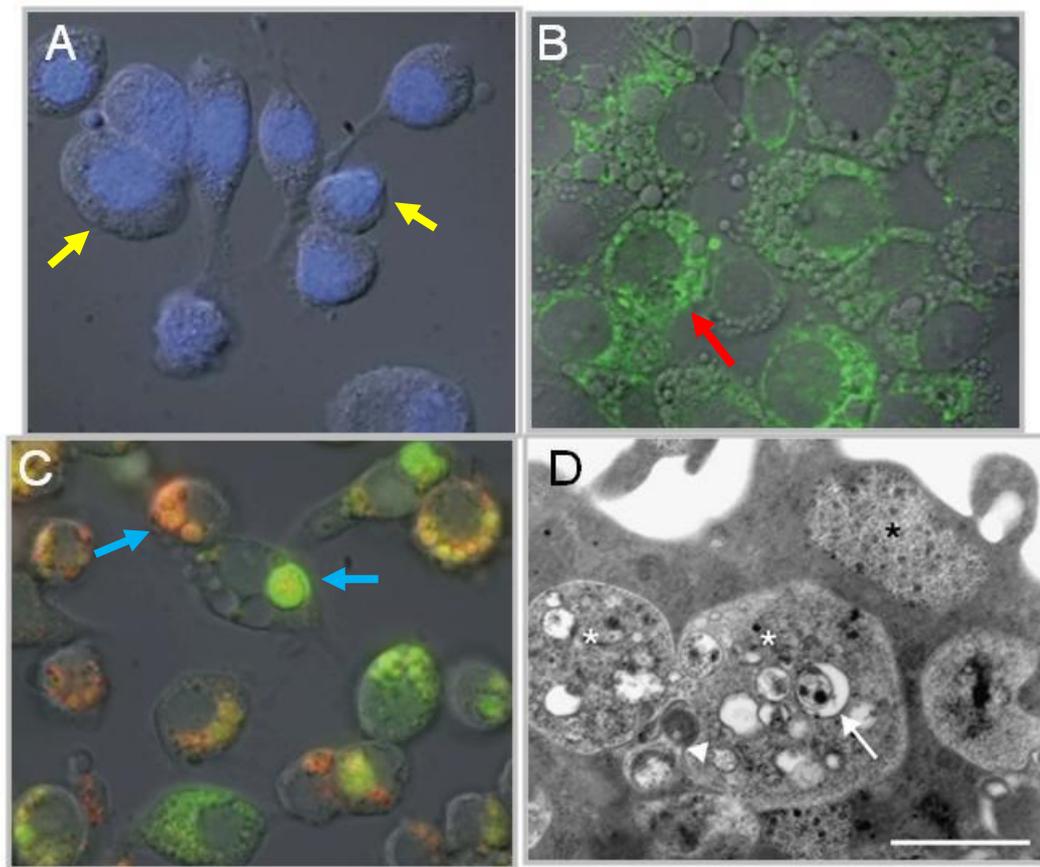


Fig. 4: Características das células BME26. Figuras A-C, mostram imagens de microscopia de fluorescência em sobreposição com DIC (contraste de interferência diferencial). Em A, mostra marcação de núcleos por DAPI (seta amarela). Em B, observa-se marcação de mitocôndria por rodamina (seta vermelha). Em C, mostra as vesículas coradas com Laranja de Acridina (seta azul). A figura D, mostra inclusão de glicogênio marcada por um asterisco preto (*), imagem de microscopia eletrônica de transmissão (Modificado de Esteves et al., 2008).

Assim como outras linhagens de células de carrapato, o tempo de duplicação dessa linhagem é altamente influenciado pela temperatura de incubação, suplementação do meio, histórico de passagens, e pode ir de 5 a 15 dias dependendo do meio utilizado (Munderloh et al., 1989). As células BME26 possuem um crescimento relativamente lento, com um tempo de duplicação de aproximadamente 15 dias. Quando a garrafa atinge uma boa confluência de número de células é realizado um repique apenas para manutenção dessas células. Porém, atualmente em nosso grupo, devido à característica heterogênea das células, os experimentos utilizam garrafas sincronizadas, que consiste em fazer um inóculo inicial de 10^7 células por garrafa para que após 15 dias de incubação, com 2 trocas

de meio (1 por semana), estas garrafas possuam o dobro do número de células, aproximadamente 2×10^7 e com isso mantenha características mais homogêneas.

Estudos do grupo, ainda não publicados, mostraram que as células BME26 eram resistentes a inúmeros tratamentos quando comparadas com outras linhagens celulares de mamíferos. Tratamentos como a exposição à radiação ultravioleta, ausência de soro fetal bovino, incubação com peróxido de hidrogênio, não causaram morte celular expressiva nas células BME26, quando comparados com as linhagens celulares de mamíferos. Geralmente as BME26 suportaram tempos e/ou quantidades maiores de exposição. Possíveis mecanismos associados a essa “resistência”, nas células BME26, ainda são desconhecidos. Maiores estudos serão necessários para a melhor compreensão dos mecanismos relacionados a esse processo fisiológico e sua importância não só na fisiologia das células em cultura como também no carrapato *Rhipicephalus microplus* (Kumar et al., 2012; Cheng et al., 2009).

1.4- Metabolismo energético

Todo ser vivo é formado por biomoléculas que, em sua maioria, são sintetizadas pelos sistemas biológicos para manutenção de toda a estrutura celular. No curso da evolução os seres vivos desenvolveram a capacidade de degradar moléculas para disponibilizar energia (Fothergill-Gilmore et al., 1993). De maneira geral, processos catabólicos estão relacionados com o fornecimento de energia retirada de alimentos como carboidratos, lipídeos e proteínas, para organismos manterem suas funções vitais (Sanchez et al., 2012). A utilização destas moléculas tem como objetivo principal a obtenção de ATP para as células. Quando o ATP é hidrolizado é capaz de liberar uma grande quantidade de energia, contida nas suas ligações de fosfato, permitindo que reações importantes, que “in vitro” são termodinamicamente desfavoráveis, aconteçam com muita facilidade dentro de seres vivos. Porém, nas células, a degradação de moléculas energéticas como a glicose não acontece apenas em um passo, acontece de forma coordenada em múltiplas etapas, o que caracteriza as vias metabólicas (Kresge et al., 2005).

O metabolismo de glicose tem um papel essencial na fisiologia e no desenvolvimento de quase todos os seres vivos (Fothergill-Gilmore et al., 1993).

Com a entrada da glicose na célula, ela é então fosforilada, numa reação dependente de ATP, gerando ADP e glicose-6 fosfato reação catalizada pela hexoquinase. Nas condições intracelulares, a reação é irreversível e impede que a glicose volte ao meio extracelular. Apenas com a enzima Glicose-6 fosfatase é possível reverter essa reação. A glicose então pode ser oxidada (via das pentoses fosfatos, via glicolítica) ou armazenada (formação de glicogênio) (Kresge et al., 2005; Sanches et al., 2012).

A ocorrência da glicólise, via central do catabolismo de carboidratos, está relacionada com a necessidade de produção de energia e somente será viabilizada se houver disponibilidade de glicose e da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada (NAD^+). A degradação da glicose é catalizada por uma série de reações enzimáticas para liberar duas moléculas de piruvato, sendo parte da energia livre liberada durante o processo convertida para a formação de ATP e NADH. A hexoquinase e a piruvato quinase são importantes enzimas que catalisam respectivamente, o primeiro e o último passo da via glicolítica. O piruvato vai a acetil-CoA pela descarboxilação oxidativa catalizada pelo complexo multienzimático chamado piruvato desidrogenase, o acetil-CoA por sua vez é então completamente oxidado à CO_2 e H_2O , através das reações do ciclo de Krebs (Kresge et al., 2005; Sanches et al., 2012). Onde em várias reações do ciclo, ocorre redução dos cofatores NAD^+ e FAD. Deste modo, o ciclo de Krebs é responsável pela produção de potencial redutor. A reoxidação destes cofatores é importante para a transferência de elétrons através de reações de oxidorredução com os complexos da cadeia transportadora de elétrons, levando o elétron até o oxigênio molecular (aceptor final) e deste modo mantendo um gradiente eletroquímico de prótons, que impulsiona a síntese de ATP pela ATP sintase.

Contudo, outras vias podem ser o destino da glicose e levam a produtos especializados necessários para a célula, como síntese das pentoses fosfato e NADPH pela via das pentoses fosfatos, e a síntese de glicose pela gliconeogênese.

1.5- Estresse oxidativo e o peróxido de hidrogênio

A evolução para um processo metabólico aeróbico como a respiração e fotossíntese, teve como consequência a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês Reactive Oxygen Species) nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos. Este processo metabólico leva a diferentes tipos de ROS produzidos na célula, fazendo com que sua capacidade de causar dano oxidativo em proteínas, DNA e lipídeos seja bem ampla (Apel e Hirt, 2004; Forman e Torres, 2002; Klotz, 2002).

O oxigênio intracelular pode ser convertido a várias formas reativas por transferência de energia ou por transferência de elétrons, levando à formação de oxigênio parcialmente reduzido, resultando em uma redução sequencial de superóxido para peróxido de hidrogênio e então radical hidroxil (Fig. 5) (Apel e Hirt, 2004).

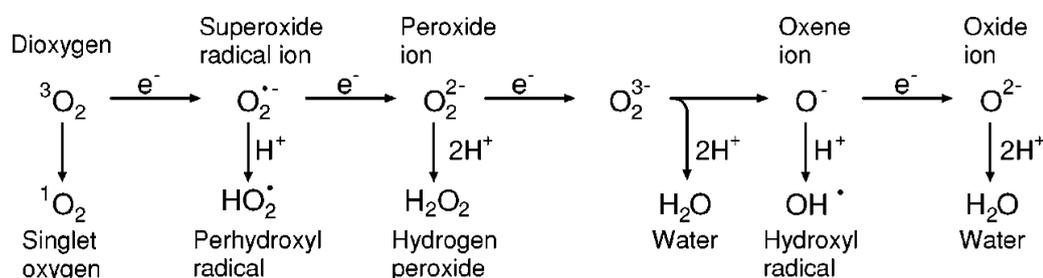


Fig. 5: Geração de ROS por transferência de energia. Redução sequencial da molécula de oxigênio. (Apel e Hirt, 2004).

A geração ROS em células vivas tem que estar em equilíbrio com a capacidade dos sistemas de defesa antioxidantes do organismo para tamponá-los (Sanz et al., 2010). Desequilíbrios causados tanto pela geração excessiva de radicais livres quanto pela reduzida eficiência dos sistemas de defesa antioxidantes levariam ao acúmulo de radicais livres e dano oxidativo associado a macromoléculas, e morte celular (Sanz et al., 2010; Barbouti et al., 2002 e Dash et al., 2008). Aumento dos níveis de ROS pode danificar vários processos celulares. Dash e colaboradores demonstraram o caso da sensibilidade ao H_2O_2 das células de fibroblasto epitelial (linhagem AH927), onde a viabilidade celular diminuiu notavelmente de forma dependente da concentração, após tratamento com várias concentrações de H_2O_2 . A DL_{50} (dose letal para 50% das células) durante 24 horas de exposição foi de 0,2 mM,

indicando que as células AH927 foram sensíveis a lesão celular induzida por H₂O₂ (Fig. 6).

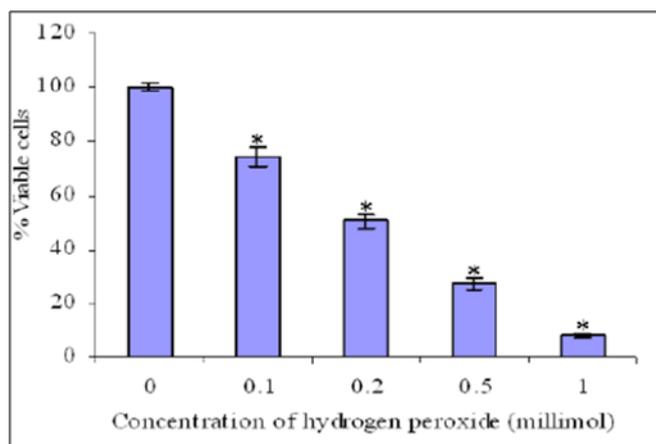


Fig. 6: Sensibilidade das células AH927 ao estresse oxidativo, induzido pelo peróxido de hidrogênio. A adição de peróxido de hidrogênio reduziu a viabilidade das células de fibroblasto epitelial (linhagem AH927), o qual foi avaliado pelo ensaio de MTT (Dash et al., 2008).

O peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) é uma substância química instável descrita com um poderoso oxidante que pode reagir com elétrons gerando radical hidroxila (OH[•]) ou água (H₂O). Pode ser decomposto pela ação da luz solar na água (foto-reação), em presença de substâncias húmicas (material orgânico dissolvido), e sua decomposição libera oxigênio molecular e calor. Em soluções diluídas, o calor é facilmente absorvido pela água presente; em soluções mais concentradas, o calor aumenta a temperatura e acelera a taxa de decomposição do reagente. Sob temperatura ambiente, o peróxido de hidrogênio é estável, se devidamente armazenado (Mattos et al., 2003). Na presença de íons de metais de transição, como o Fe e Cu, o peróxido de hidrogênio pode ser reduzido para radical hidroxil, sendo que o superóxido e o peróxido de hidrogênio são muito menos reativos que o radical hidroxil (Apel e Hirt, 2004). Por tanto, o principal risco para a célula que produz essas duas formas de ROS intermediárias é a interação com fatores que podem gerar radicais hidroxil altamente reativos (Indo et al., 2007).

Apesar do poder de reação, o peróxido de hidrogênio é um metabólito natural em muitos organismos. A concentração de H₂O₂ dentro da célula é definida pela relação entre o influxo e formação intracelular, e pelo seu efluxo e eliminação do H₂O₂. Em mamífero, a concentração fisiológica mínima de H₂O₂ seria de 0,001μM, e a máxima, gerada para fins de sinalização, estaria entre 0,5 - 0,7 μM (Stone e Yang, 2006).

Acredita-se que o transporte de H_2O_2 ocorre por livre difusão através da bicamada lipídica das membranas. No entanto, alguns trabalhos têm relatado que o transporte de H_2O_2 pode ser regulado e que esta regulação constitui um fator principal na determinação da concentração do H_2O_2 intracelular (Bienert et al., 2006). A partir de evidências diretas de que homólogos de Aquaporina, selecionados a partir de plantas e mamíferos, têm a capacidade de canalizar H_2O_2 através das membranas, mostrou-se que a difusão do H_2O_2 através das membranas pode ser limitada (Bienert et al., 2007). Esse evento, de um possível controle da entrada de H_2O_2 na célula, corrobora com artigos que tem defendido a possibilidade de que o H_2O_2 também funcione como uma molécula de sinalização para o controle de diferentes processos essenciais em plantas e mamíferos. Ou seja, tem-se uma nova visão sobre o papel do H_2O_2 como uma molécula sinalizadora, deixando de ser apenas um vilão causador de danos oxidativos. Curiosamente, muitos desses alvos estão envolvidos na produção de energia (Rhee, 2006).

O suporte para esta ideia deriva principalmente de duas observações. Primeiro, que a aplicação de H_2O_2 em níveis fisiológicos (concentração baixa) estimula a proliferação e/ou a sobrevivência de células de mamíferos, enquanto que a aplicação da catalase inibe a proliferação e a sobrevivência das células. O outro fato é que as células de mamíferos geram O_2^- e/ou H_2O_2 em resposta a vários estímulos fisiológicos, e a família de enzimas NADPH oxidase (NOX), foi identificada como tendo a função principal de gerar O_2^- e/ou H_2O_2 , de uma forma regulada (Stone e Yang, 2006). Além disso, foi visto que muitos tipos de células podem produzir H_2O_2 em resposta a fatores de crescimento celular, a insulina, e a fatores de sobrevivência celular (Rhee, 2006). Sadidi e colaboradores demonstraram que o H_2O_2 em pequenas concentrações atua como segundo mensageiro na via de sinalização de sobrevivência celular, aumentando a sobrevivência das células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) via PI3K e AKT (Sadidi et al., 2009).

Por tanto, como discutido acima, um aspecto chave do estudo de H_2O_2 em sistemas vivos envolve assegurar que a sua concentração intracelular é fisiologicamente relevante, ressaltando a importância de compreender a natureza exata da gama fisiológica para diferentes concentrações de H_2O_2 .

1.6- Mecanismos antioxidantes

Uma vez que concentrações elevadas de H_2O_2 são tóxicas para uma ampla gama de macromoléculas, o sistema de detoxificação de H_2O_2 deve ter sido desenvolvido no início da evolução. Para evitar a destruição celular, por um aumento da quantidade de ROS, as células possuem estratégias sofisticadas que mantêm sob controle as concentrações de superóxido, peróxido de hidrogênio, e metais de transição (Apel e Hirt, 2004; Indo et al., 2007).

Uma das formas de controle destas espécies reativas é por mecanismos enzimáticos, tendo como principais a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Apel e Hirt, 2004). A superóxido dismutase é a primeira enzima a atuar contra ROS, eliminando o superóxido formando o peróxido de hidrogênio. A catalase, localizada principalmente nos peroxissomos, e a glutathione peroxidase, localizada no citoplasma, elimina o peróxido de hidrogênio gerando molécula de água e oxigênio estável (Apel e Hirt, 2004; Klotz, 2002). A atividade da glutathione peroxidase está relacionada com o equilíbrio dos níveis de glutathione reduzida e glutathione oxidada, onde a enzima glutathione reductase reduz a glutathione oxidada em glutathione reduzida, pela oxidação do NADPH proveniente da via das pentoses, e a glutathione peroxidase oxida a glutathione reduzida, dando continuidade então no ciclo da atividade da glutathione peroxidase (Apel e Hirt, 2004; Forman e Torres, 2002)

Em insetos os estudos de defesas antioxidantes começaram no início de 1990, e tem sido demonstrado que existe um sistema de defesa antioxidante semelhante à de outros organismos existentes (Sanz et al., 2010). Também foi observado que a enzima superóxido dismutase de insetos faz parte das primeiras defesas enzimáticas contra ROS, que são principalmente gerados pelo metabolismo aeróbio (Datkhile et al., 2009). Parker e colaboradores (2004) sugerem então um padrão geral de defesa da superóxido dismutase para todos os metazoários.

Em geral, os insetos possuem uma alta atividade de catalase, que normalmente, coincide com baixos níveis de glutathione peroxidase e glutathione reductase (Sanz et al., 2010), possivelmente a superóxido dismutase e a catalase são as duas principais enzimas envolvidas na proteção antioxidante (Ahmad e Pardini, 1990). Datkhile e colaboradores (2009) verificaram um aumento na atividade destas duas enzimas em *Chironomus ramosus* submetidos à radiação ionizante, enquanto que na atividade de glutathione peroxidase e glutathione reductase não houve resposta.

O estudo do estado oxidativo dos animais em geral, e insetos em particular, pode ser uma ferramenta para indicar peculiaridades fisiológicas na atividade metabólica, que está diretamente relacionado com a produção de ROS e hábitos alimentares (Sanz et al., 2010).

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Estudar a resistência das células embrionárias de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BME26) ao peróxido de hidrogênio e avaliar o envolvimento do metabolismo de carboidratos neste evento.

2.2- Objetivos Específicos

1. Determinar a viabilidade das células BME26 em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, e calcular a DL₅₀ (Dose de H₂O₂ letal para 50% das células BME26);
 - a- Verificar se alguns componentes do meio Leibovitz 15 (L-15) completo possuem potencial redutor com capacidade de degradar o peróxido de hidrogênio, e com isso gerar uma possível proteção nas células BME26 pelo meio;
2. Verificar a produção de ROS após a incubação com peróxido de hidrogênio na célula BME26, de modo curso temporal, através do uso de um marcador de ROS (DHE, Dihidroetideo) e comparar com a viabilidade celular por MTT;
3. Verificar se o consumo de oxigênio é alterado após a incubação com peróxido de hidrogênio na célula BME26, de modo curso temporal;
4. Avaliar a transcrição e a atividade da Catalase;
5. Analisar a transcrição de genes de algumas vias do metabolismo de carboidrato:
 - a- Via Glicolítica → Hexoquinase e Piruvato quinase.
 - b- Via das Pentoses Fosfato → Glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH).
 - c- Gliconeogênese → Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Preparo do Meio Leibovitz-15

As células BME26 são cultivadas em meio Leibovitz 15 (L-15) - Sigma L4386 (Anexo 1) – complementado com uma série de nutrientes, *meio L-15 completo* (Munderloh et al., 1989). O meio L-15 completo é preparado em duas etapas. Primeiro é preparado um meio concentrado contendo o meio L-15 (Sigma) adicionado de aminoácidos, glicose, solução de minerais e solução de vitaminas (Anexo 2). A partir do meio concentrado é feita uma diluição de 3:1 com água estéril e suplementado com soro fetal bovino 10% (Nutricell®, inativado por aquecimento), Caldo Triptose fosfato 10%, Penicilina/Streptomicina (100U/mL e 100µg/mL, respectivamente) (Gibco), e o meio L-15 completo foi utilizado tanto na manutenção quanto nos experimentos com as células BME26.

3.2- Manutenção da cultura de células BME26

A linhagem BME26 é mantida conforme descrito por Esteves e colaboradores (2008). As células são mantidas a 34°C em garrafas de cultura (25 cm²) com 5 mL de meio L-15 completo, trocado semanalmente (Esteves et al., 2008). Para a manutenção da cultura, monocamadas são subcultivadas ao alcançarem uma densidade de aproximadamente 10⁷ células/mL. As células aderidas são descoladas por jateamento delicado de meio completo, com o auxílio de uma agulha (0,70 x 25mm 22G) adaptada a uma seringa de 5mL. Para sincronização são repicadas 10⁷ células por garrafa para serem usadas para experimento após duas semanas. A densidade de células é determinada em hemocitômetro (câmara de Neubauer) e a exclusão de células mortas é avaliada pelo corante Azul de Trypan (0,4%, Sigma).

3.3- Ensaio de viabilidade das células BME26

3.3.1- Método colorimétrico quantitativo por MTT

A viabilidade das células foi medida através da atividade de enzimas desidrogenases que reduzem o MTT à formazan. O MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), é um tetrazole amarelo, que é reduzido a formazan (coloração roxa), dentro das células. As células BME26 foram semeadas em placas 24 poços (5x10⁵ células/poço) com 500µl de meio completo, incubadas na estufa 34°C com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Em cada poço da placa de 24 poços, foram adicionados 50µl de substrato MTT na

concentração de 5mg/ml. Em seguida as células foram incubadas na estufa a 34°C por 2 horas tomando-se o cuidado de protegê-las da luminosidade. Após este período foi feita a dissolução dos cristais formazan com 1ml de isopropanol+HCl (0,15% de HCl em isopropanol) e lido no espectrofotômetro a 570 nm. A média dos controles foi considerada 100%, para o cálculo de porcentagem de viabilidade dos tratamentos.

3.3.2- Análise de integridade membranar

Para análise morfológica por microscopia as células foram semeadas (3×10^5 células/poço) sobre lamínulas colocadas no fundo do poço da placa de 24 poços. As células foram então incubadas na estufa 34°C com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Após o tratamento as células foram diretamente coradas por adição de Hoechst 33342 (0,4 µg/ml, concentração final) durante 10 min e, em seguida iodeto de propídio (2 µg/ml, concentração final) durante mais 2 min. As incubações foram realizadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Todo o conteúdo sobrenadante foi descartado, e as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas sobre lâminas de vidro com uma gota de glicerol. As células foram observadas no microscópio de fluorescência (modelo Eclipse 80i, Nikon, Japão), e as imagens foram obtidas com aumento de 400x.

3.4- Determinação da produção de ROS

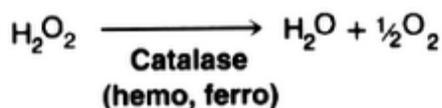
Para marcar a quantidade de ROS intracelular, foi utilizada marcação com DHE (Dihidroetideo). As células foram semeadas (3×10^5 células/poço) sobre lamínulas colocadas no fundo do poço da placa de 24 poços, e incubadas na estufa 34°C com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Para o experimento foi utilizado 5µM de DHE, diluído em PBS, com incubação de 15 minutos no escuro, sob leve agitação. Em seguida, as células foram lavadas 1 vez com PBS para serem fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com uma gota de glicerol. As células foram observadas no microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager A.2 HB 100, câmera AxioCam MRc5), com comprimento de onda de excitação próximo de 510nm e emissão 595nm, e as imagens foram obtidas com aumento de 400x.

3.5- Preparo do homogenato de células BME26

As células BME26 foram semeadas em placas 24 poços (5×10^5 células/poço) com 0,5mL de meio completo. Após incubação na estufa 34°C com peróxido de hidrogênio, as células foram lavadas com PBS, descoladas da placa por jatos com 500 μl PBS, transferidas para o eppendorf e centrifugadas a 6000rpm por 10 minutos, a 4°C . O pelete de células foi ressuspendido em tampão de lise: Tris-HCl 10mM, pH 7.4, 10% de coquetel de inibidores de protease (sigma-aldrich, nº. cat.: P2714) e 1% de Triton-X 100, seguido de 3 ciclos de 30 segundos de agitação no Vortex e 30 segundos no gelo. O lisado de células foi centrifugado, para eliminar debris e restos de células não lisadas, a 6000rpm por 10 minutos, a 4°C , (centrifuga Hettich, Mikro 200R) e foi recolhido apenas o sobrenadante em um eppendorf novo.

3.6- Atividade da Catalase

O ensaio de atividade da catalase (EC 1.11.1.6), (Worthington, 1988) consistiu na utilização de um tampão de fosfato de potássio (KPO_4) a 0,05 M, pH 7,0; Peróxido de hidrogênio a 0,059 M e 50 μl de homogenato. O tampão fosfato e o homogenato foram adicionados em uma cubeta de quartzo e a reação foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio. A diminuição de H_2O_2 foi monitorada por minuto medindo a absorbância a 240 nm no espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível 1240), na temperatura de 25°C . A velocidade da reação foi determinada pelo consumo do H_2O_2 por minuto, onde uma unidade de enzima é a quantidade necessária para converter 1 mol de peróxido de hidrogênio em seu produto ($\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). A atividade enzimática será expressa como U/mg de proteína do sobrenadante pela quantidade de proteína total (em mg) na amostra. A concentração de proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.



3.7- Consumo de Oxigênio

Foram utilizadas 5 garrafas sincronizadas com 5ml de meio L-15 completo. O H₂O₂ foi diretamente adicionado no meio de cultura da garrafa, e incubado por diferentes tempos na estufa 34°C. A taxa de consumo de oxigênio das células foi estimada por um eletrodo Oxytherm em fase líquida (Hansatech). Todo meio da garrafa de cultura de células foi descartado, as células foram lavada com 2ml de PBS pH 7, e ressuspendidas em 2ml de PBS pH 7. As células foram contadas na câmara de Neubauer e adicionados, na cubeta do oxígrafo, 10⁷ células em 1ml de PBS. O consumo de O₂ foi medido durante 10 minutos. De modo a confirmar a respiração foi utilizado 7mM de cianeto de potássio.

3.8- Transcrição relativa do gene de catalase e dos genes do metabolismo de carboidratos

Foram semeada 5x10⁵ células/poço na placa de 24 poços com 0,5mL de meio L-15 completo. Foi feita extração de RNA total das diferentes condições das células BME26, usando o reagente TRIzol® (Invitrogen) de acordo com a recomendação do fabricante. O cDNA correspondente foi sintetizado a partir de 1µg de RNA com o kit para síntese de cDNA da Applied Biosystems (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits), como recomendado pelo fabricante.

A quantificação dos transcritos referentes a genes do metabolismo energético foi realizada por PCR quantitativo (modelo StepOne Plus™ Real Time PCR, Applied) através da utilização do kit *reagente Power SYBR Green PCR Master Mix*, no sistema de placa de 96 poços. A análise da transcrição relativa dos genes do metabolismo foi feita com relação ao gene de referência ELF1A (Nijhof et al., 2009). A expressão relativa foi determinada através de análise das Ct no programa computacional Relative Expression Software Tool-REST (Pfaffl, 2001).

Sequências dos genes para catalase (CAT) e glicose-6 fosfato desidrogenase (G6PDH) de *R. microplus* foram obtidos no GenBank. Já sequências dos genes para hexoquinase (HK), piruvato kinase (PK) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) foram obtidas de *Ixodes scapularis* pelo GenBank (Tabela 1), e posteriormente utilizadas para um BLAST com base no transcriptoma do *R. microplus*, obtido através do sequenciador Illumina Solexa (dado não publicado, obtido através da colaboração com o professor Itabajara Vaz).

Primers específicos para os genes foram desenhado manualmente baseado nas sequencias de *R. microplus*. Segue em anexo a lista dos primers utilizados (Anexo 3).

Tabela 1: Genes obtidos no GenBank para BLAST no transcriptoma de *R. microplus*.

Gene alvo	Acesso Genebank
Hexoquinase	XM_002412706.1 <i>Ixodes scapularis</i> hexokinase
Piruvato kinase	XM_002407420.1 <i>Ixodes scapularis</i> pyruvate kinase
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	XM_002413329.1 <i>Ixodes scapularis</i> phosphoenolpyruvate carboxylase kinase

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1- Viabilidade das células BME26 frente a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio

A viabilidade das células BME26 foi avaliada diante de diferentes concentrações de H_2O_2 , para evidenciar a sensibilidade das células a morte por H_2O_2 . Após o tratamento de 24 horas com diferentes concentrações de H_2O_2 foi observado somente uma queda na viabilidade celular após a concentração de 2,2 mM, sendo progressiva até 13,2 mM com aproximadamente 90% de morte. A DL_{50} após 24 horas de exposição ficou entre 5,4 - 6,6 mM (Fig. 7).

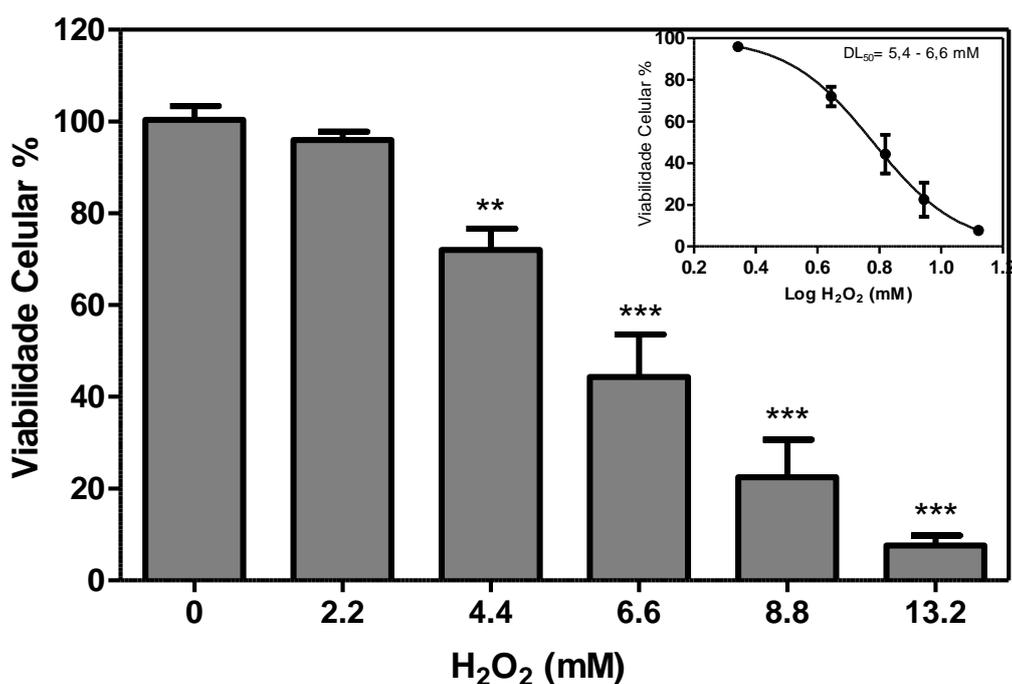


Fig. 7: Viabilidade das células BME26 frente a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio. Efeito do H_2O_2 na viabilidade das células BME26 para avaliação da concentração de H_2O_2 que é letal a 50% das células. Células BME26 foram incubadas com diferentes concentrações de H_2O_2 (2,2; 4,4; 6,6; 8,8 e 13,2 mM) por 24 horas. O insert mostra a DL 50% calculada (One-way ANOVA, $P < 0,0001$ e teste de múltipla comparação Dunnett).

4.2- Análise de integridade membranar das células BME26 incubadas com peróxido de hidrogênio

Foi utilizado um método qualitativo de avaliação da viabilidade por microscopia de fluorescência, através da dupla marcação com Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo, apenas para confirmação de morte celular em algumas concentrações de peróxido de hidrogênio. Sendo o Hoechst 33342 uma molécula lipofílica, possui fácil passagem pela membrana celular, e por ter afinidade por DNA dupla fita, cora todos os núcleos de células viáveis e não viáveis. O Iodeto de Propídeo não é permeável a célula e também cora núcleos, porém apenas de células com a permeabilidade da membrana celular comprometida. Desta forma é possível separar as células em processo de morte celular como as com dupla marcação e as viáveis como as coradas apenas com o Hoechst 33342.

Na fig. 8, observa-se a marcação de perda da integridade membranar pela entrada do Iodeto de Propídeo (seta verde) nas células BME26, que é uma característica de um dos eventos de morte celular (Li et al., 2012). A marcação com Hoechst está representada pela seta rosa, e quando sobrepostas as marcações tanto com Hoechst quanto com Iodeto de Propídeo, seta amarela.

As figuras 8 A e B mostram as células BME26 controle, que se encontram viáveis. Após a incubação com 2,2 mM de H₂O₂, figura 8 C e D, algumas células encontram-se marcadas com Iodeto de Propídeo, demonstrando que nesta concentração existem poucas células com perda de integridade membranar quando comparado com todas as células do campo coradas apenas com Hoechst, que são células viáveis.

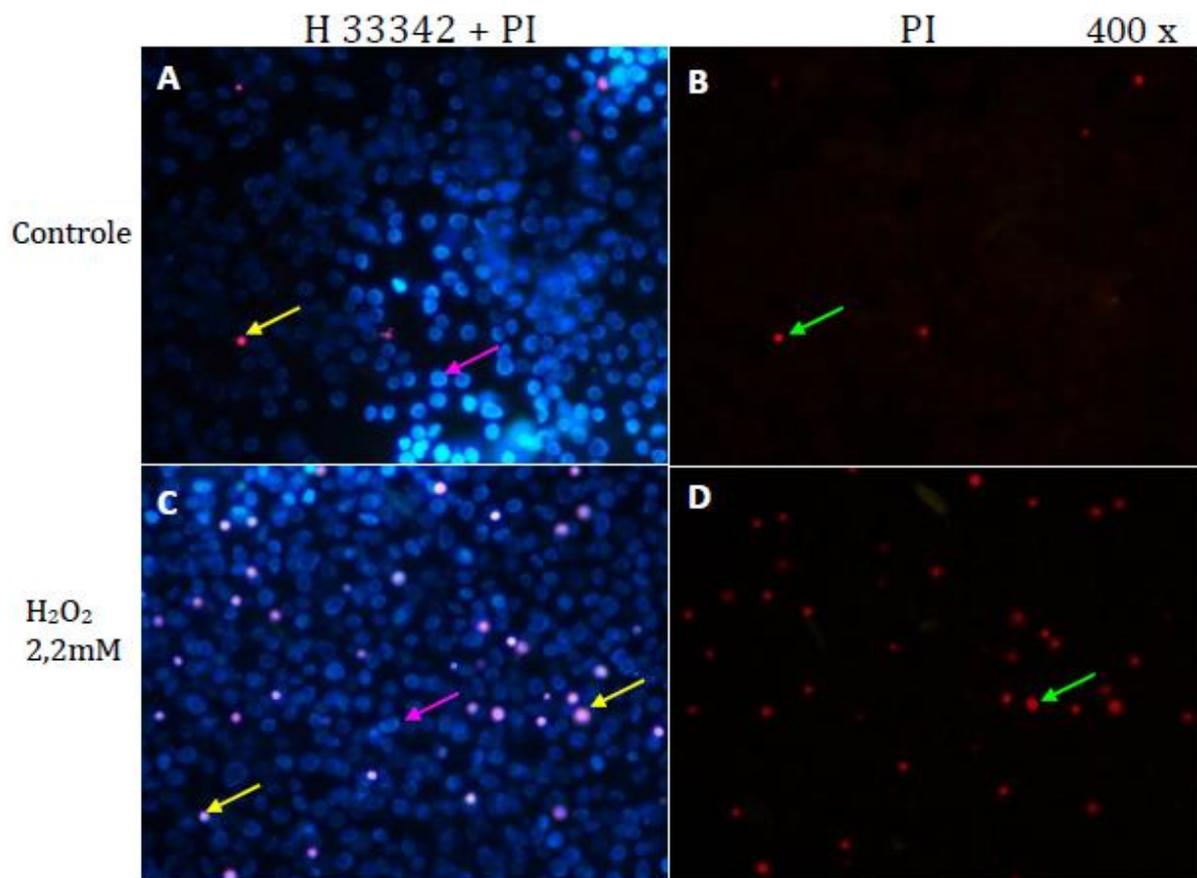


Fig. 8: Análise de integridade membranar nas células BME26 incubadas com H_2O_2 2,2mM por 24 horas. Dupla marcação em células BME26, com Hoechst 33342 (H 33342) e Iodeto de Propideo (PI). A e B- Células BME26 controle. C e D- Células BME26 tratadas com 2,2 mM de H_2O_2 por 24 horas. Análise por microscopia de fluorescência, sendo (A e C) células marcadas com H 33342 e PI; e (B e D) células marcadas somente com PI. Núcleos corados com Hoechst, setas rosas. Núcleos corados com Iodeto de Propideo, setas verdes. E sobreposição das marcações, setas amarelas. Aumento de 400x, (Microscópio de Fluorescência - modelo Eclipse 80i, Nikon).

4.3- Glutathiona Reduzida não afeta a interação entre as células BME26 e o peróxido de hidrogênio no meio L-15 completo

Para avaliar se o peróxido de hidrogênio poderia estar reagindo com componentes do meio L-15, e sofrendo degradação, foi feita uma análise de possíveis compostos do meio L-15 que teriam essa capacidade (Anexo 2). A glutathiona reduzida é conhecida por apresentar essa possível reação “*in vitro*”, (Gilbert et al., 1957). Diante deste conhecimento, foi avaliada a viabilidade das células BME26 que foram submetidas a uma curva de concentração de H_2O_2 , incubadas nos diferentes meios L-15 (Fig. 9); meio L-15 sem glutathiona reduzida (linha azul), com o dobro da concentração de glutathiona reduzida (linha vermelha), e com concentração normal de glutathiona reduzida no meio L15 que é de $3,9 \mu M$ (linha preta) e o perfil de viabilidade se manteve. A comparação dos perfis indica que não houve uma influência da glutathiona reduzida na sensibilidade das células BME26 ao H_2O_2 .

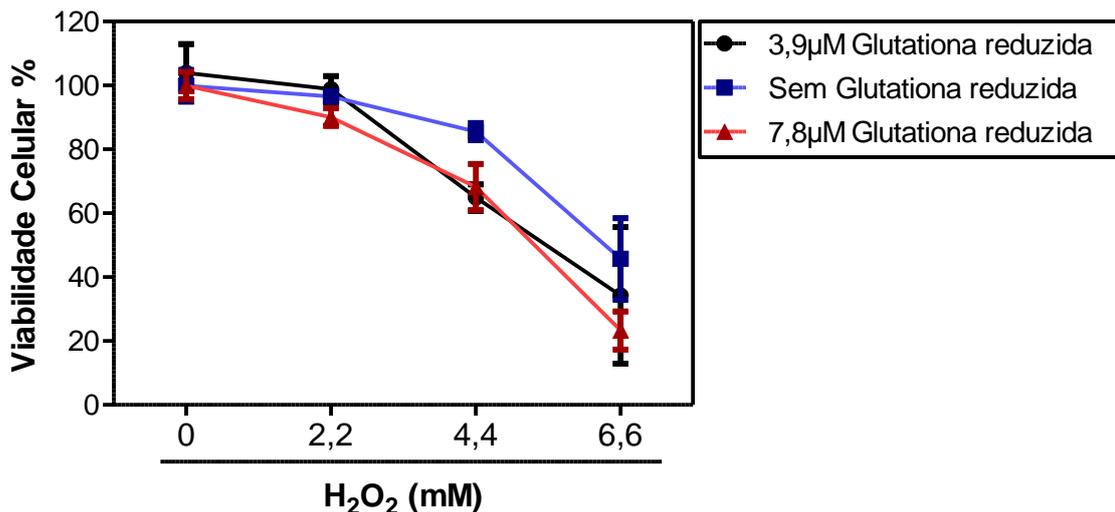


Fig. 9: Efeito da glutathiona Reduzida na interação entre células BME26 e H_2O_2 no meio L-15 completo. A glutathiona reduzida foi removida (linha azul) ou teve sua concentração dobrada ($7,8 \mu M$) no meio (linha vermelha) para avaliar a sua contribuição na degradação do H_2O_2 . Não houve diferença estatística na comparação dos perfis de viabilidade celular frente ao tratamento com H_2O_2 no meio sem glutathiona e no meio com o dobro de glutathiona, em relação ao meio com concentração normal de glutathiona ($3,9 \mu M$) (Two-way ANOVA).

4.4- Diminuição da geração de ROS nas células BME26 ao longo do tempo de incubação após tratamento com peróxido de hidrogênio

Para marcar a quantidade de ROS intracelular, foi utilizada marcação com DHE (Dihidroetideo), uma molécula que quando oxidada forma dois produtos fluorescentes, o 2-hidroxi-etideo, relacionada com a formação de ânion radical superóxido e etideo que reflete a geração de peróxido de hidrogênio, identificando uma maior atividade de peroxidases (Zhao et al., 2003). É possível observar a marcação do DHE (a molécula floresce entre o laranja e o vermelho) no microscópio de fluorescência principalmente pela formação do etideo, com afinidade pelo núcleo.

Observamos na figura 10 a marcação de DHE após 2 horas de incubação com 2,2 mM (B e E) e 4,4 mM (C e F). Com a concentração de 2,2 mM a marcação de ROS é muito sutil (Fig. 10-E). No entanto, na concentração de 4,4 mM de H_2O_2 observa-se uma marcação de DHE em algumas células BME26 (Fig. 10-F seta azul) representando um grande aumento de ROS em relação ao controle (Fig. 10-D). As células BME26 apresentaram uma autofluorescência (Fig. 10-b) quando expostas a luz de mesmo comprimento de onda que o que é usado para excitação da molécula DHE. A viabilidade avaliada por MTT em 2,2 mM de H_2O_2 aumentou aproximadamente 11 por cento, porém esse aumento não possui relevância estatística e em 4,4 mM de H_2O_2 diminuiu aproximadamente 13 por cento (Fig. 10-G).

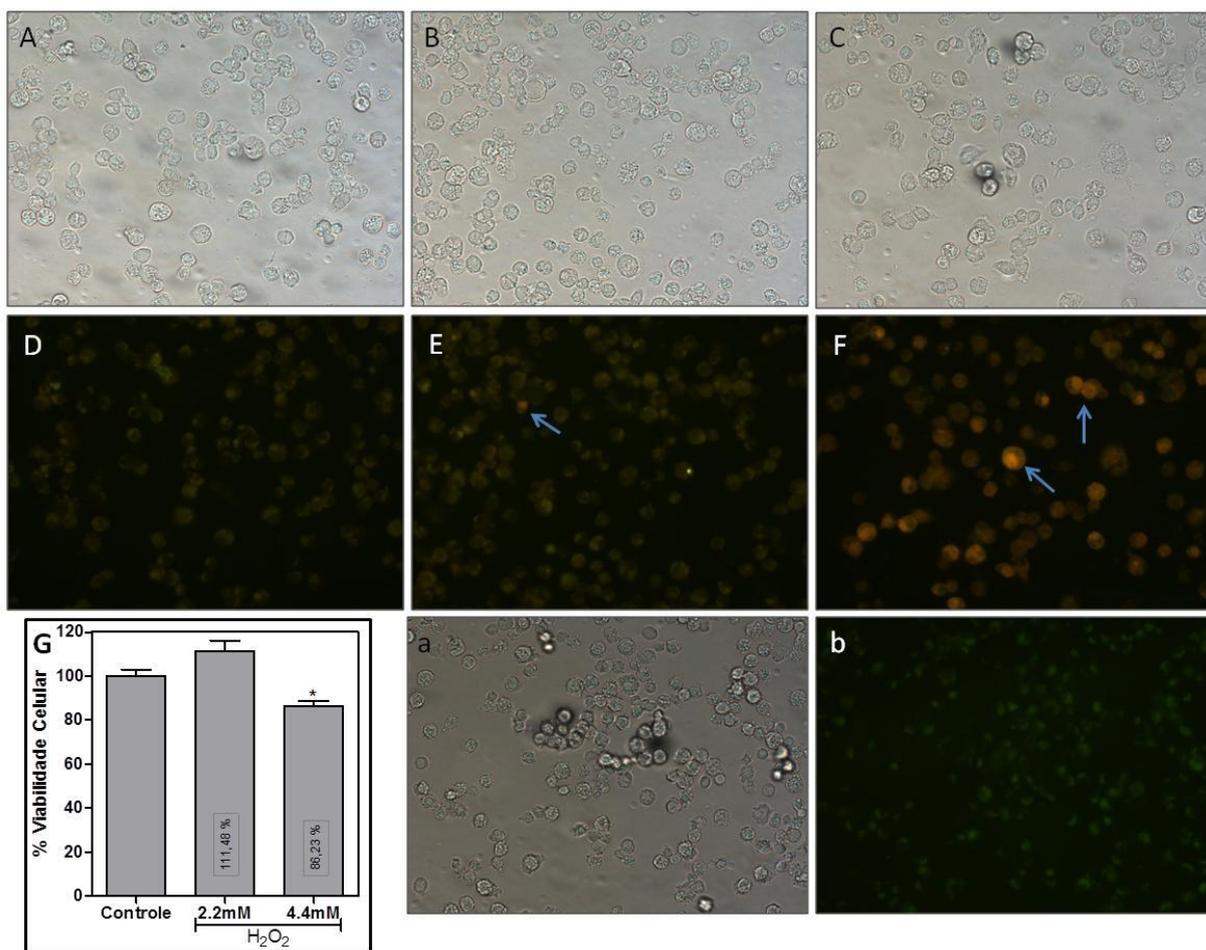


Fig. 10: Avaliação de geração de ROS nas células BME26 após tratamento com H₂O₂ por 2 horas. Em A e D observa-se as células controle, sem H₂O₂; em B e E, as células foram tratadas com 2,2 mM de H₂O₂; e em C e F, as células foram tratadas com 4,4 mM de H₂O₂. As setas azuis apontam a marcação por DHE. O Insert (a) e (b) mostra a autofluorescência das células BME26. Nas imagens A-C e (a), microscopia por DIC. Nas imagens D-F e (b) microscopia de fluorescência. Aumento de 400x, Microscópio de Fluorescência, modelo Zeiss Axio Imager A.2 HB 100, câmera Axiocam MRc5. G- Gráfico de viabilidade celular, avaliada pelo ensaio por MTT, após o tratamento com H₂O₂ por 2 horas (One-way ANOVA, P < 0,05 e teste de múltipla comparação Dunnett).

Após 12 horas (Fig. 11) de tratamento com 2,2 mM (E) e 4,4 mM de H₂O₂ (F), as células foram coradas com DHE para observação da produção de ROS. A concentração de 2,2 mM (Fig. 11-E) mostra uma coloração muito parecida com o controle (Fig. 11-D), parecendo não haver marcação de ROS. Na concentração de 4,4 mM de H₂O₂ observamos uma marcação muito sutil do DHE em algumas células BME26 (Fig. 11-F seta azul). A viabilidade avaliada por MTT em 2,2 mM de H₂O₂ diminuiu aproximadamente 6 por cento, porém não representado estatisticamente e em 4,4 mM de H₂O₂ diminuiu aproximadamente 25 por cento (Fig. 11-G).

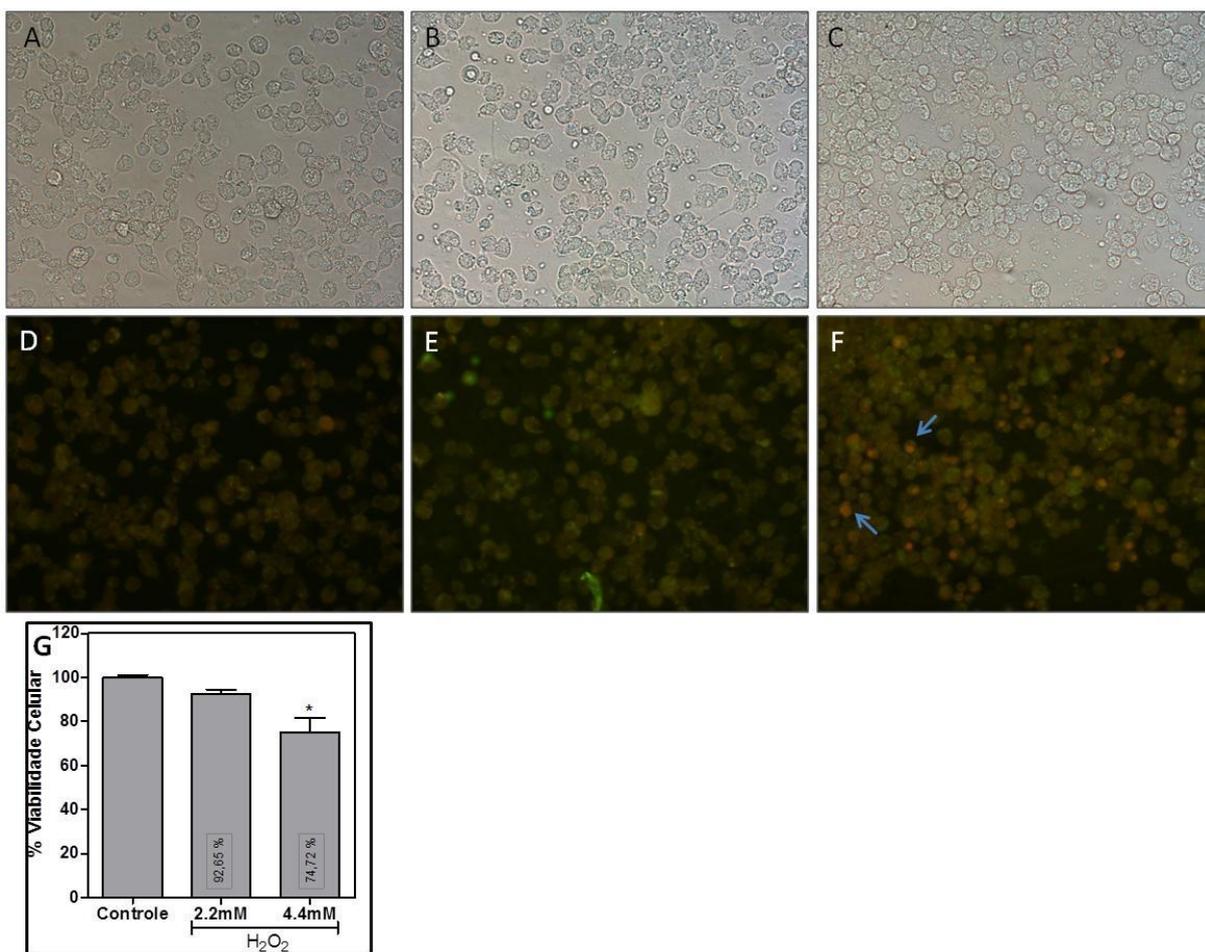


Fig. 11: Avaliação de geração de ROS nas células BME26 após tratamento com H₂O₂ por 12 horas. Em A e D observa-se as células controle, sem H₂O₂; em B e E, as células foram tratadas com 2,2 mM de H₂O₂; e em C e F, as células foram tratadas com 4,4 mM de H₂O₂ por 12 horas. As setas azuis apontam a marcação por DHE. As imagens A-C mostram microscopia por DIC, e imagens D-F, microscopia de fluorescência. Aumento de 400x, Microscópio de Fluorescência, modelo Zeiss Axio Imager A.2 HB 100, câmera AxioCam MRc5. G- Gráfico de viabilidade celular, avaliada pelo ensaio por MTT, após o tratamento com H₂O₂ por 12 horas (One-way ANOVA, P < 0,05 e teste de múltipla comparação Dunnett).

Observamos na figura 12, a marcação de DHE no controle (A e D) para comparação nos diferentes tratamentos. Após 24 horas de incubação com 2,2 mM (Fig. 12-E) e 4,4 mM de H₂O₂ (Fig. 12-F), não é possível observar diferença na marcação de ROS por DHE em relação ao controle (Fig. 12-D). A viabilidade avaliada por MTT em 2,2 mM de H₂O₂ diminuiu aproximadamente 9 por cento e em 4,4 mM de H₂O₂ diminuiu aproximadamente 33 por cento (Fig. 12-G).

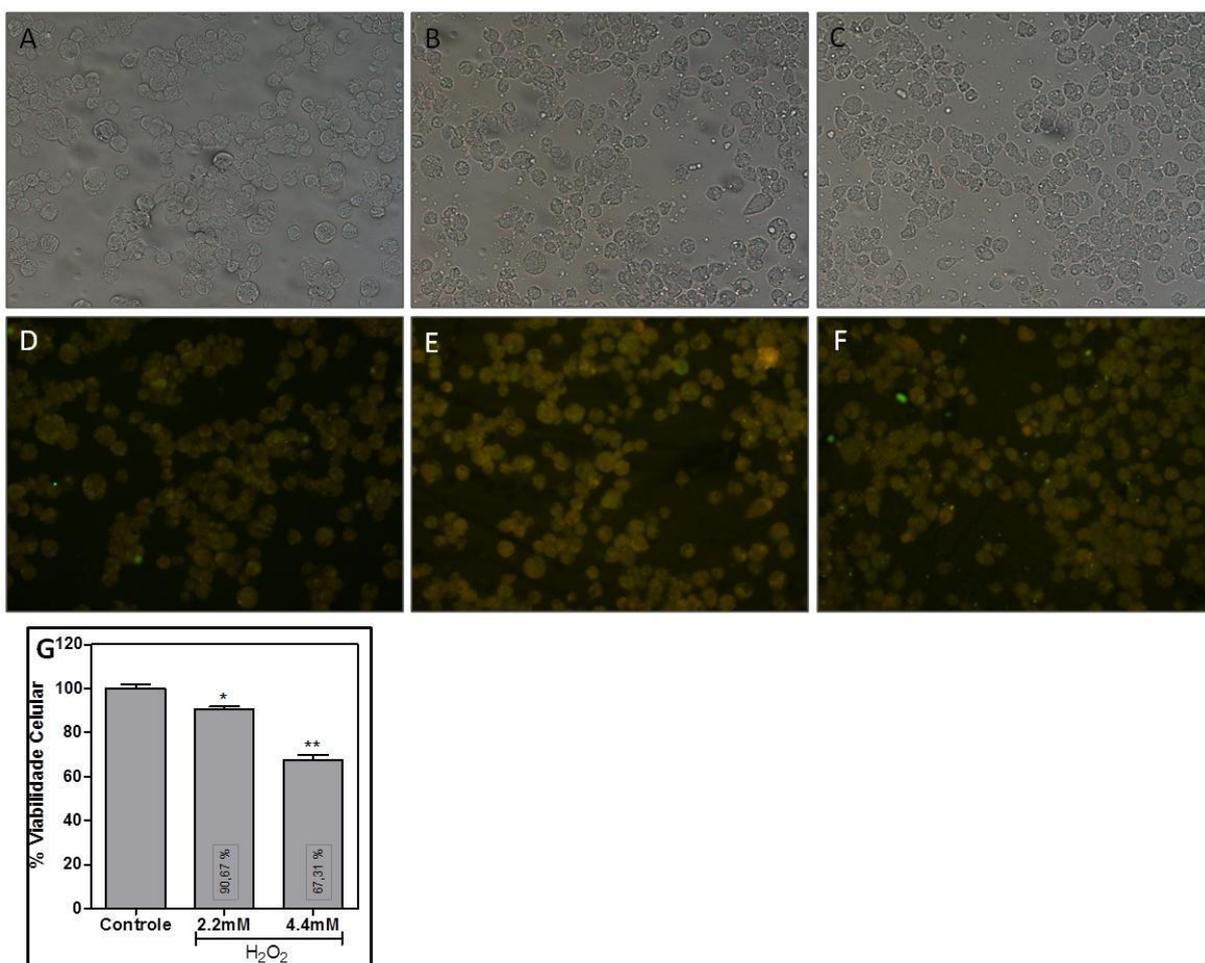


Fig. 12: Avaliação de geração de ROS nas células BME26 após tratamento com H₂O₂ por 24 horas. Foi utilizada a sonda fluorescente DHE para mensurar a geração de hidroperóxidos. Em A e D observa-se as células controle, sem H₂O₂; em B e E, as células foram tratadas com 2,2 mM de H₂O₂; e em C e F, as células foram tratadas com 4,4 mM de H₂O₂ por 24 horas. As imagens A-C mostram microscopia por DIC, e imagens D-F, microscopia de fluorescência. Aumento de 400x, Microscópio de Fluorescência, modelo Zeiss Axio Imager A.2 HB 100, câmera AxioCam MRc5. G- Gráfico de viabilidade celular, avaliada pelo ensaio por MTT, após o tratamento com H₂O₂ por 24 horas (One-way ANOVA, P < 0,05 e teste de múltipla comparação Dunnett).

Desse modo, é importante evidenciar a observação do sinal da marcação de ROS em 4,4 mM de H₂O₂ nos tempos de 2, 12 e 24 horas de incubação. Onde é possível avaliar que o sinal de ROS se mostra mais fraco no tratamento de 12 horas (Fig. 11-F) do que com apenas 2hs (Fig.10-F) com 4,4 mM H₂O₂. E no tempo de 24 horas com 4,4 mM de H₂O₂ (Fig. 12-F) ficou sem marcação de ROS, igual ao controle (Fig. 12-D). Isso indica que pode estar diminuindo a concentração de H₂O₂ intracelular ao longo do tempo de incubação. Porém, a viabilidade das células BME26, (observadas nas figuras 10-G, 11-G e 12-G; com os tempos de 2, 12 e 24

horas de incubação com H₂O₂, respectivamente) continuam diminuindo em resposta ao tempo de incubação com H₂O₂.

4.5- Alteração da taxa de respiração das células BME26 frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio

A taxa de consumo de oxigênio em células BME26 tratadas com 4,4mM de H₂O₂ foi avaliada em diferentes tempos de incubação. Foi observado que em 2 horas de incubação com H₂O₂ ocorre um aumento na taxa de consumo de oxigênio. Sendo a taxa de oxigênio das células BME26 controle aproximadamente de 12,5 $\mu\text{mol} / \text{minuto}$ em 10^7 células, a taxa de oxigênio das células BME26 incubadas com H₂O₂ por 2 horas, aumentou para aproximadamente 14,5 $\mu\text{mol} / \text{minuto}$ em 10^7 células. E em 12 horas de incubação com H₂O₂ a taxa de respiração das células BME26 retornou ao nível das células do controle (Fig. 13).

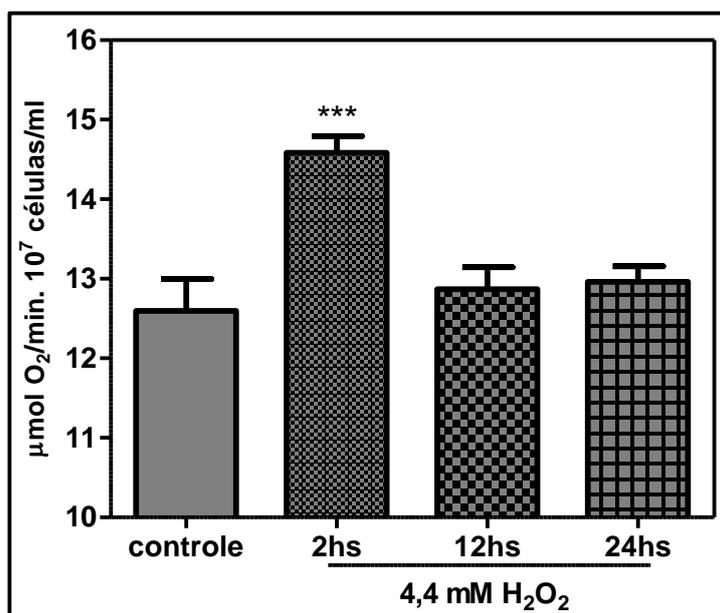


Fig. 13: Taxa de consumo de oxigênio nas células BME26 frente ao tratamento com 4,4 mM de H₂O₂ em diferentes tempos de incubação. A quantidade de oxigênio consumida em $\mu\text{mol}/\text{minuto}$ em 10^7 células BME26 tratada com 4,4mM de H₂O₂ por 2, 12 e 24 horas (One-way ANOVA, $P < 0,0001$ e teste de múltipla comparação Tukey).

4.6- Catalase não altera sua atividade em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio em células BME26, porém possui resposta a nível transcricional

A Catalase atua como primeira linha de defesa em células que se encontram em estado de estresse oxidativo, eliminando o peróxido de hidrogênio, gerando molécula de água e oxigênio estável (O_2). Porém em células BME26 incubadas com 2,2 mM de H_2O_2 , nos diferentes tempos, não houve aumento da atividade de catalase em resposta a um possível estresse oxidativo gerado pela presença de H_2O_2 (Fig. 14).

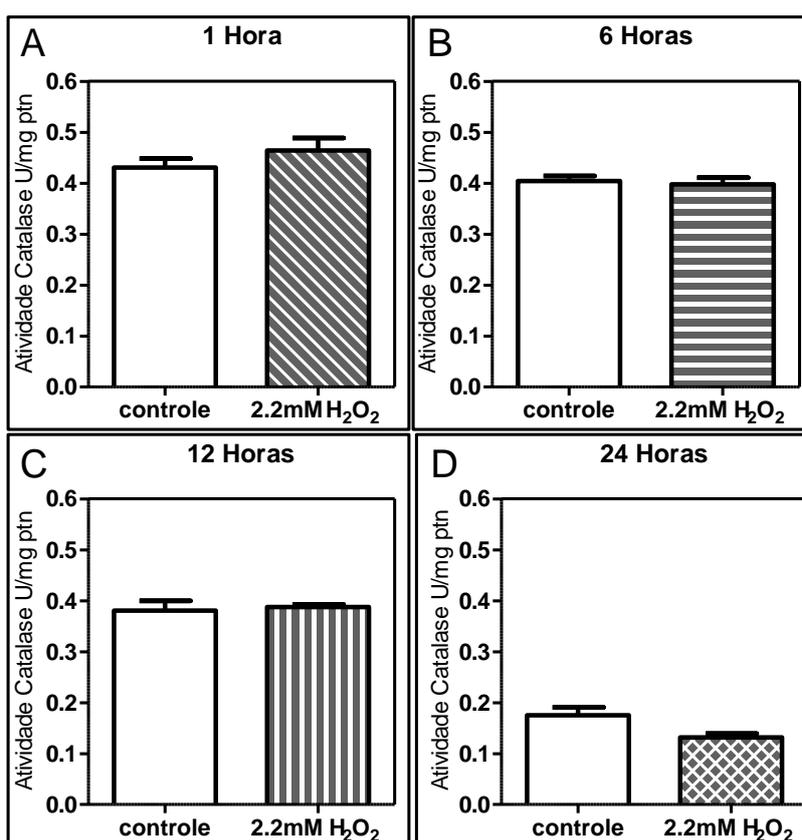


Fig. 14: Atividade específica de catalase nas células BME26 com 2,2 mM de H_2O_2 em diferentes tempos de incubação. Foi avaliada a atividade da catalase nas células BME26 incubadas com 2,2mM de H_2O_2 por 1 hora (A), 6 horas (B), 12 horas (C) e 24 horas (D). Não houve diferença estatística entre o tratado e seus respectivos controles (Teste T, não pareado).

Porém quando analisada a transcrição de catalase, esta apresentou um aumento significativo de sua transcrição após 24 horas de tratamento com 2,2 mM de H₂O₂ (Fig. 15).

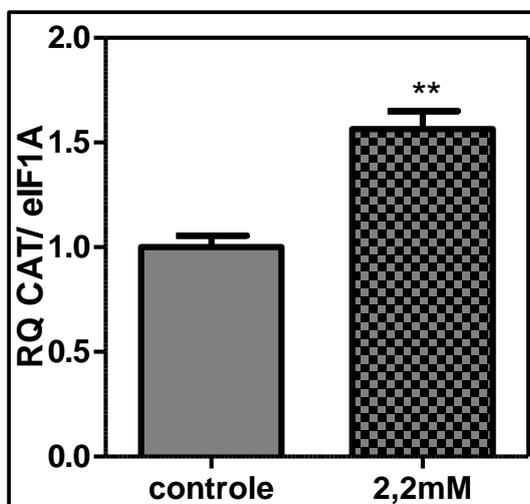


Fig. 15: Transcrição relativa da catalase frente ao tratamento com H₂O₂ nas células BME26. As células foram incubadas com 2,2 mM por 24 horas. Gene de referência ELF1A (Teste T, não pareado. P < 0,05).

4.7- Genes da via glicolítica foram avaliados frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio nas células BME26

A Hexoquinase e a Piruvato Kinase são enzimas que catalisam a primeira e a última etapa da glicólise, respectivamente. A transcrição relativa de Piruvato Kinase é diminuída em células tratadas com 2,2mM de H₂O₂ por 24 horas (Fig. 17). Diferentemente, a transcrição de hexoquinase foi aumentada nas células BME26 tratadas com 2,2 mM de H₂O₂ por 24 horas (Fig. 16).

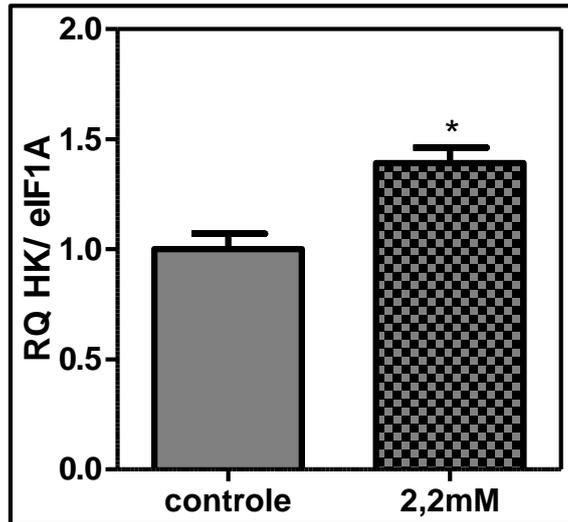


Fig.16: Transcrição relativa do gene da hexoquinase frente ao tratamento com H_2O_2 nas células BME26. As células foram incubadas com 2,2 mM de H_2O_2 por 24 horas. Em relação ao gene de referência ELF1A (Teste T, não pareado. $P < 0,05$).

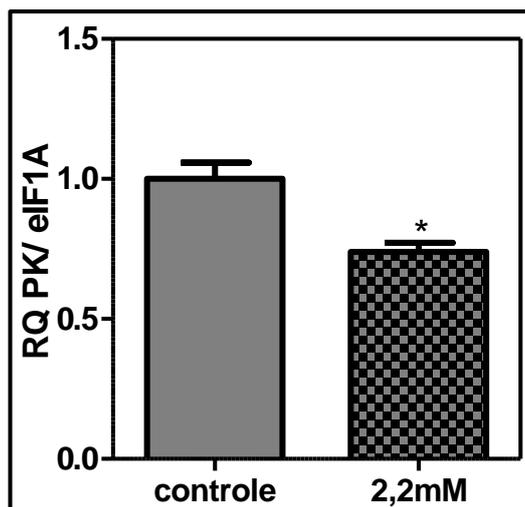


Fig.17: Transcrição relativa do gene da Piruvato kinase frente ao tratamento com H_2O_2 nas células BME26. As células foram incubadas com 2,2 mM de H_2O_2 por 24 horas. Em relação ao gene de referência ELF1A (Teste T, não pareado. $P < 0,05$).

4.8- Avaliação da expressão do gene da gliconeogênese (PEPCK) frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio nas células BME26

A enzima PEPCK é uma importante reguladora da via gliconeogênica. A transcrição relativa de PEPCK de células tratadas com 2,2mM de H₂O₂ por 24 horas em relação ao controle e observou-se que não houve diferença estatística (Fig. 18).

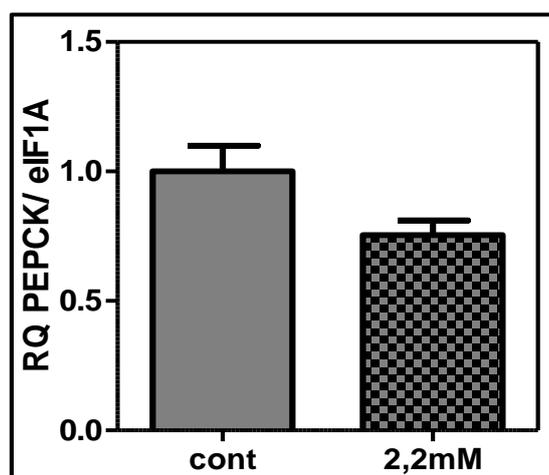


Fig.18: Transcrição relativa do gene da PEPCK frente ao tratamento com H₂O₂ nas células BME26. As células foram incubadas com 2,2 mM de H₂O₂ por 24 horas. Em relação ao gene de referência ELF1A (Teste T, não pareado. Sem diferença estatística).

4.9- Avaliação da expressão do gene da via das pentoses fosfato (G6PDH) frente ao tratamento com peróxido de hidrogênio nas células BME26

A G6PDH é a enzima reguladora da via das pentoses fosfato. Ao ser fosforilada no carbono seis, a glicose-6 fosfato pode ser utilizada pela via das pentoses fosfato para a formação de ribose-5 e de NADPH.

A transcrição relativa do gene de G6PDH aumentou muito em células BME26 tratadas com 2,2mM de H₂O₂ por 24 horas, em relação controle (Fig. 19).

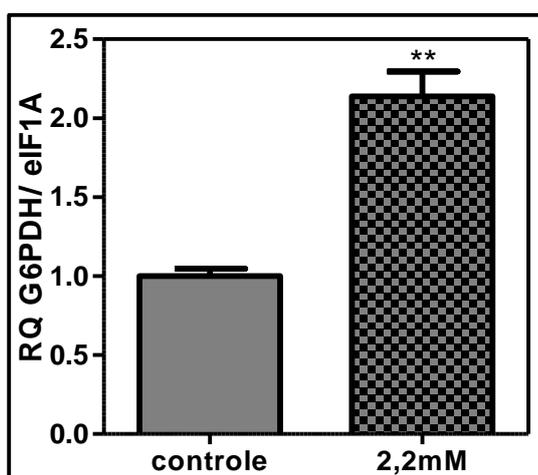


Fig.19: Transcrição relativa do gene da G6PDH frente ao tratamento com H₂O₂ nas células BME26. As células foram incubadas com 2,2 mM de H₂O₂ por 24 horas. Em relação ao gene de referência ELF1A (Teste T, não pareado. P < 0,05).

DISCUSSÃO



5. DISCUSSÃO

Em organismos aeróbios a produção de ROS ocorre em equilíbrio mantido principalmente por sistemas de defesa antioxidantes. Quando acontece um desequilíbrio nesta relação, os danos causados por essas espécies reativas são gerados na célula e promovem distúrbios que muitas vezes são irreversíveis. Dentre os vários componentes celulares, muitos danos são ocasionados a proteínas, lipídeos e ao DNA, podendo ser associados a várias condições patológicas como a diabetes, sepse e doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (Indo et al., 2007).

Nesta dissertação, observou-se uma elevada resistência das células BME26 ao peróxido de hidrogênio, onde surpreendentemente as células BME26 apresentaram a DL₅₀ de 24 horas de exposição entre 5,4 - 6,6 mM de H₂O₂ (Fig. 7), enquanto que as células AH927 com DL₅₀ de 0,2 mM de H₂O₂ no mesmo tempo de 24 horas de incubação (Fig. 6). Desse modo, ao comparar o perfil de viabilidade das células BME26 com o perfil de outras células de mamífero, tratadas com H₂O₂, observa-se que as células BME26 apresentam uma resistência aproximadamente 30 vezes maior em relação a células de mamífero. Li e colaboradores em 2012, também demonstraram a sensibilidade das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) à exposição de 18 horas ao H₂O₂ (250-1000 µM), que resultou em perda grave de viabilidade celular, avaliada por MTT. As células HUVEC tratadas com 1mM de H₂O₂, por 18horas, apresentou uma diminuição de 80% da viabilidade celular (Li et al., 2012). Diante de tais evidências, houve um interesse do grupo em aprofundar os estudos relacionados à resistência das células BME26 e suas correlações metabólicas com este fenômeno.

Na literatura, identifica-se ainda a existência da influência do meio de cultivo em sistemas de cultura celular. Os meios de cultura, geralmente apresentam componentes para manutenção de nutrientes da célula que são, muitas vezes, pró ou antioxidantes, como por exemplo, vitamina C, selênio, sais minerais (contendo metais como ferro), glutathione reduzida, entre outros (Halliwell, 2007). Porém não se pode fazer uma avaliação destes componentes separadamente, pois há alguns agentes que separadamente são antioxidativos, mas que em conjunto com outro componente passam a ser pró-oxidativos, sendo o contrário recíproco também. Por exemplo, o ácido ascórbico, é conhecido como um agente antioxidante, porém em

uma reação entre o H_2O_2 e o Fe^{3+} a adição de ácido ascórbico aumenta fortemente a formação de radical hidroxila (Aruoma, 1996) (Observar Anexo 2, Preparo de Solução de minerais, para o meio L15).

A glutathiona reduzida também é descrita como um agente antioxidante. Porém, Gilbert e colaboradores (1957) demonstraram que em ambiente com alta pressão de O_2 , a glutathiona reduzida pode ser oxidada pelo O_2 , com formação de H_2O_2 . Diante destes fatos, avaliamos o efeito da glutathiona reduzida, na resistência das células BME26. Durante o preparo do meio L15 é necessário adicionar a solução de minerais, onde se encontra a glutathiona reduzida (Anexo 2).

Desta forma, para avaliar a existência da possível influência antioxidante da glutathiona reduzida do meio L15, foram testados três tipos de meio L15 com diferentes concentrações de glutathiona reduzida, sendo uma com a concentração normal de glutathiona reduzida (concentração final de $3,9 \mu\text{M}$), outra com o dobro da concentração e outro meio ausente de glutathiona reduzida. Em teoria, no caso de haver um papel antioxidante, o dobro de glutathiona eliminaria mais H_2O_2 e deixaria a célula mais resistente ainda; e no caso do meio ausente de glutathiona reduzida, a célula seria mais sensível ao H_2O_2 . Contudo, pelo resultado demonstrado na figura 9, a alteração de glutathiona reduzida não afeta a sensibilidade da BME26 ao H_2O_2 , apresentando o mesmo perfil de viabilidade perante o tratamento com H_2O_2 , nas três formulações de meio L15. Até o momento este estudo vem mostrando que a resistência da BME26 ao H_2O_2 é inerente à célula e não ao meio. Mesmo com as evidências mostradas neste trabalho, ainda é preciso um aprofundamento maior nos estudos para confirmação dos mecanismos relacionados à resistência ao H_2O_2 observada nas células BME26.

Muitos trabalhos têm focado na avaliação de algumas estratégias bioquímicas, utilizadas por artrópodes hematófagos como *Rhodnius prolixus* (Oliveira, P.L. et al., 1995), *Aedes aegypti* (Pereira et al., 2007), *R. microplus* (Maya-monteiro et al., 2000), para lidar com o estresse oxidativo causado pela alimentação com alto teor de heme. Dentre elas se destacam a redução do heme livre através da formação de agregados insolúveis, ou formação de complexos entre a molécula de heme e proteínas ligantes, ou pela simples degradação do heme (Oliveira, M.F. et al., 1999; Paiva-Silva et al., 2006).

No intuito de avaliar a existência de ROS dentro das células BME26 e a influência disto na viabilidade, foram feitas as marcações com DHE (uma sonda

fluorescente usada para detectar anions superóxidos intracelulares) (Zhao et al., 2003). Avaliamos se o aumento de H_2O_2 no meio extracelular corresponderia a um aumento intracelular. Em paralelo à marcação de ROS nos tempos de 2, 12 e 24 horas de incubação com H_2O_2 (Figuras 10, 11 e 12, respectivamente) foi determinada a viabilidade celular. Foram adotadas duas concentrações, uma próxima à DL_{50} (4,4mM) e uma bem menor (2,2mM). O ensaio preliminar mostra que em duas horas de tratamento com H_2O_2 (Fig. 10) as células parecem ter uma marcação mais forte principalmente na maior concentração de H_2O_2 (4,4mM). Porém as células tratadas mantêm a viabilidade próxima a do controle. Isso sugere que o estresse gerado em duas horas aumenta ROS intracelular, mas ainda não afeta a viabilidade. Em doze horas (Fig. 11) as células tratadas com a menor concentração de H_2O_2 , possuem marcação igual a do controle. Já nas células tratadas com a maior concentração de H_2O_2 , parece ter havido uma diminuição da marcação de ROS. Com 24 horas (Fig. 12), ambas as concentrações de H_2O_2 mostraram uma diminuição na marcação de ROS. Apesar de preliminar, os dados sugerem que ao longo do tempo houve uma diminuição da marcação de ROS. Trabalhos futuros incluem a quantificação de H_2O_2 intracelular para comparação com outras células onde normalmente, em células de mamífero, a concentração de H_2O_2 intracelular pode ir até 0,7 μ M.

O sistema antioxidante enzimático é representado por enzimas como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, e glutathione S-transferase. Freitas e colaboradores (2007) avaliaram algumas enzimas de resposta ao estresse oxidativo no carrapato *R. microplus*. Enzimas como a glutathione S-transferase e a catalase aumentam bastante suas atividades no 20º dia da embriogênese, próximo à eclosão, sendo que no primeiro dia após a eclosão a atividade diminui. Além disso, observou-se uma correlação positiva entre a atividade da glutathione S-transferase e consumo de O_2 em embriões. Este aumento pode ser explicado pelo aumento do metabolismo durante o desenvolvimento embrionário em *R. microplus*. Nas células BME26 também foi avaliada a atividade de catalase frente ao tratamento somente com a menor concentração de H_2O_2 (Fig. 14), não havendo aumento da atividade em relação ao controle. Apesar de não haver um aumento da atividade, a transcrição do gene de catalase aumentou após 24 horas de tratamento com a menor concentração de H_2O_2 (Fig. 15). Esse aumento transcricional do gene de catalase pode estar relacionado com um preparo celular para um possível futuro

estresse, levando em consideração o fato de somente após 24 horas com 2,2 mM de H₂O₂ poucas células apresentarem evidências de morte. É importante ressaltar também que nestes momentos citados no trabalho não ocorre uma grande renovação de células pela divisão celular pelo fato destas células (BME26) precisarem de 15 dias para se replicarem.

De um modo geral atribui-se que existe um vínculo estreito entre desafio ao sistema redox com mobilização direta de respostas antioxidantes (Forman et al., 2004). Por tanto, células e tecidos devem manter um ambiente redutor, fornecendo um gradiente eletroquímico necessário para o fluxo de elétrons em que mantenha o equilíbrio entre produção de energia e manutenção do potencial redox (Santiago et al., 2008).

O estado redox em células é primeiramente estimado pelo potencial de redução de cofatores como o NADH e NADPH, onde a manutenção deste equilíbrio é mantida por enzimas à custa de energia metabólica (Forman et al., 2004). A taxa de produção de ROS mitocondrial é fortemente dependente do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e é inversamente relacionada com a disponibilidade de ADP, utilizado para dirigir a síntese de ATP. Sabendo que através cadeia transportadora de elétrons, fontes de H₂O₂ e de superóxido são geradas continuamente, há um aumento da produção de ROS no estado 4 da respiração oxidativa, e diminuição no estado 3 (Korshunov et al., 1997). Então, investigamos a taxa de respiração das células BME26 (Fig. 13) após o tratamento com a concentração próxima à DL₅₀, 4,4 mM de H₂O₂, e com apenas 2 horas de tratamento houve um aumento da taxa respiratória, porém após este tempo a taxa de consumo de O₂ voltou aos níveis do controle. Este dado é intrigante se comparado ao aumento da marcação de ROS por DHE também na concentração de 4,4mM de H₂O₂ por 2 horas. Consequentemente, como não existe grandes alterações da viabilidade neste momento, estes dados demonstraram que há uma relação entre o aumento da taxa de respiração e o aumento de ROS intracelular, seguido de um forte indício da célula possuir um maquinário bem estabelecido de prevenção de estresse oxidativo, pois no tempo seguinte de 12 horas tanto a respiração celular quanto os níveis de ROS intracelular se normalizam semelhantes as células controle.

Atualmente admite-se que exista uma relação entre a regulação do estresse oxidativo e o metabolismo energético (Santiago et al., 2008). Dentro deste contexto,

observou-se que a célula BME26 é capaz de ativar genes do metabolismo nos tratamentos com H_2O_2 . No presente trabalho a transcrição da hexoquinase aumentou. Entretanto foi observada uma diminuição dos transcritos de piruvato quinase em resposta ao tratamento com 2,2mM de H_2O_2 . Atualmente tem sido amplamente estudada tanto a relação entre estresse oxidativo, ou prevenção do estresse oxidativo com importantes vias metabólicas, como também na modulação de componentes de vias metabólicas por H_2O_2 . (Wu et al., 2012; Tavender e Bulleid, 2010; Gruning et al., 2011; da-Silva et al., 2004; Pramanik et al., 2011; Santiago et al., 2008; Niwa et al., 2003).

Existem em mamíferos quatro isoformas da hexoquinase (I – IV). A distinção entre ambas se refere a afinidade pela glicose, a inibição pela glicose-6-fosfato (Glc-6-P), além de sua distribuição celular. Ainda não existe um estudo da hexoquinase em carrapato. Mas em mamífero foi visto que a hexoquinase-II se ancora à mitocôndria próximo ao translocador ADP/ATP, utilizando o ATP produzido pela fosforilação oxidativa. O ADP, subproduto da hexoquinase, controla o potencial de membrana, assim como a geração de ROS em cérebro e coração de rato (Wu et al., 2012; da-Silva et al., 2004). Dessa forma, a inibição da hexoquinase resulta em um aumento do potencial da membrana mitocondrial e geração de H_2O_2 . Devido a esse processo, a atividade da ATPsintase é reduzida levando a um menor fluxo através da cadeia transportadora de elétrons. Sendo assim, a hexoquinase ancorada à mitocôndria desempenha um papel fundamental, prevenindo o estresse oxidativo, e reduzindo assim a geração de ROS através da reciclagem de ADP pela atividade da ATPsintase (Wu et al., 2012 e da-Silva et al., 2004).

Estudando a piruvato quinase, foi descoberto que o metabolismo central se auto-regula para manter em equilíbrio o metabolismo redox quando a respiração aumenta. Em fungos que tiveram a piruvato kinase modificada para manter sempre uma baixa atividade, isso fez com que a obtenção de energia fosse promovida por respiração e não por fermentação (já que é um organismo capaz de atuar tanto por uma via quanto por outra). O aumento da respiração não levou a um aumento de ROS, frente a moléculas oxidantes, pois baixa atividade de piruvato kinase estimulou a via das pentoses fosfato, aumentando o metabolismo antioxidante, e impediu a acumulação ROS. Através de uma etapa catalítica, esta reconfiguração autônoma do metabolismo central de carbono em fungos evitou o estresse oxidativo sobre mudanças entre fermentação e respiração (Gruning et al., 2011).

Por tanto vimos que nas células BME26 ocorre um aumento da transcrição de G6PDH em resposta ao tratamento com H_2O_2 , como mostrado na figura 19. A via das pentoses fosfato é um importante caminho para a modulação do potencial redox. A glicose-6-fosfato, no sentido oxidativo, é irreversivelmente convertida em ribulose 5-fosfato, CO_2 e geração de NADPH, um co-factor que atua na manutenção redox de muitas enzimas antioxidantes. Como futuras estratégias planejamos a utilização de inibidores de G6PDH. Assim após uma busca, encontrados na literatura dois inibidores competitivos de G6PDH, a 6-aminonicotinamida e um esteróide adrenal, dehidroepiandrosterona (DHEA), como consequência eles reduzem os níveis de NADPH (Schwartz e Pashko, 2004). Zhang e colaboradores (2012) mostraram que elevados níveis de glicose prejudicam a atividade da G6PDH em células endoteliais e do rim, o que leva à diminuição da sobrevivência celular. Em células β do pâncreas foi visto que a alta concentração de glicose também inibe a atividade e a expressão da G6PDH. De modo que tal inibição levou a um aumento de ROS e da apoptose, e diminuição da proliferação e secreção de insulina em células pancreáticas β . Determinando a importância da atividade de G6PDH na morte celular, Tian e colaboradores (1999) demonstraram que esta desempenha um papel crítico na morte celular por afetar o potencial redox celular. Tais dados mostram que, os inibidores de G6PDH induzem morte celular pelo aumento de H_2O_2 intracelular. Como consequências da inibição de G6PDH incluem-se um aumento significativo na apoptose, perda de proteínas tióis e degradação de G6PDH. Já a superexpressão de G6PDH levou a um aumento da resistência à morte celular induzida por H_2O_2 . (Tian, 1999; Tian,1998; Zhang 2010).

Como propostas futuras há uma grande importância em analisar as células resistentes ao H_2O_2 frente a outros indutores de estresse oxidativo, e verificar se haveria uma redução da resistência das células BME26 após o tratamento com inibidores de G6PDH.

CONCLUSÕES



6. CONCLUSÕES

Portanto concluímos que as células BME26 possuem uma resistência ao H_2O_2 , aproximadamente 30 vezes maior do que outras células de linhagens de mamífero, sendo descrito neste trabalho que essa resistência não está relacionada com a proteção do meio L15, e nem com a atividade da enzima catalase.

A glutathiona reduzida presente no meio L15 completo não interfere na viabilidade das células BME26 frente o tratamento com H_2O_2 , confirmando que a resistência observada é inerente às célula BME26, e não tem participação do meio neste evento. E foi visto que a atividade de catalase não sofre variação com diferentes tratamentos com H_2O_2 , porém a resposta transcricional é alterada.

Embora as células BME26 possuam ao longo do tempo um mecanismo de eliminação de ROS, a queda na viabilidade celular se mantém progressiva.

Contudo, os dados indicaram que possíveis mecanismos de resistência da célula BME26 estariam associados ao aumento do consumo de O_2 e alterações dos transcritos de alguns genes do metabolismo de carboidratos. A transcrição do gene de hexoquinase aumenta, enquanto que a transcrição de piruvato kinase diminui frente ao tratamento com H_2O_2 . A transcrição do gene de G6PDH tem um grande aumento, indicando que pode estar havendo um aumento do potencial redutor associado ao desafio pelo H_2O_2 . Diante deste panorama a hipótese do grupo é que existe um papel importante da G6PDH na prevenção do estresse oxidativo em células embrionárias do carrapato *R. microplus* (BME26).

REFERÊNCIAS



7. REFERÊNCIAS

- Ahmad,S., Pardini,R.S. (1990). Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology & Medicine*, 8: 401- 413.
- Apel,K. e Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:373-399.
- Aruoma,O.I. (1996). Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 73 (12):1617-1625.
- Barbouti,A., Doulias,P.T., Nousis,D., Tenopoulou,M., Galaris,D. (2002). DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: Bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. *Free Radical Biology and Medicine*. 33:691-702.
- Bell-Sakyi,L., Zwegarth,E., Blouin,E.F., Gould,E.A. and Jongejan,F. (2007). Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology*, 23:450-457.
- Bienert,G.P., Møller,A.L.B., Kristiansen,K.A., Schulz,A., Møller,I.M., Schjoerring,J.K., Jahn,T.P. (2007). Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide across Membranes. *The Journal of Biological Chem.* 282(2):1183–1192.
- Bienert,G.P., Schjoerring,J.K., Jahn,T.P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758:994-1003.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Campos,E., Moraes,J., Façanha,A.R., Moreira,E., Valle,D., Abreu,L., Manso,P.P.A., Nascimento,A., Pelajo-Machado,M., Lenzi,H., Masuda,A., Vaz-Jr,I., Logullo,C. (2006), Metabolic activity of *Boophilus microplus* during embryonic development. *Veterinary Parasitology* 138, 349–357;
- Cheng,I.C., Lee,H.J., Wang,T.C. (2009). Multiple factors conferring high radioresistance in insect Sf9 cells. *Mutagenesis*. 24 (3): 259–269
- Corson,M.S., Teel,P.D., Grant,W.E., (2004). Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick (*Boophilus* spp.) population dynamics. *Ecol. Modell.*, 180:487–514.

- Dash,R., Acharya,C., Bindu,P.C., Kundu,S.C. (2008). Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. *BMB reports*. 41(3): 236-241
- da-Silva,W.S., Gomez-Puyou,A., Gomez-Puyou,M.T., Moreno-Sanchez,R., De Felice,F.G., Meis,L., Oliveira,M.F., Galina,A. (2004). Mitochondrial Bound Hexokinase Activity as a Preventive Antioxidant Defense. Steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 39846–39855.
- Datkhile,K.D., Mukhopadhyaya,R., Dongre,T.K., Nath,B.B. (2009). Increased level of superoxide dismutase (SOD) activity in larvae of *Chironomus ramosus* (Diptera: Chironomidae) subjected to ionizing radiation. *Comp Biochem Physiol C*, 149: 500–506.
- de la Fuente,J., Blouin,E.F., Manzano-Roman,R., Naranjo,V., Almazán,C., Perez de la Lastra,J.M., Zivkovic,Z., Jongejan,F., Kocan,K.M. (2007). Functional genomic studies of tick cells in response to infection with the cattle pathogen, *Anaplasma marginale*. *Genomics*, 90:712–722.
- Embrapa (2005). Disponível em: <http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/sala/noticias/jornaldoleite.php?id=163>
- Esteves,E., Bastos,C.V., Zivkovic,Z., de la Fuente,J., Kocan,K.M., Blouin,E.F., Ribeiro,M.F.B., Passos,L.M.F., Daffre,S. (2009). Propagation of a Brazilian isolate of *Anaplasma marginale* with appendage in tick cell line (BME26) derived from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology* 161:150-153
- Esteves,E., Lara,F.A., Lorenzini,D.M., Costa,G.H.N., Fukuzawa,A.H., Pressinotti,L.N., Silva,J.C., Ferro,J.A., Kurtti,T.J., Munderloh,U.G., Daffre,S. (2008). Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38:568–580.
- Flehtmann, C. H. W. (1977). *Elementos de acarologia*. Livraria Nobel, São Paulo.
- Forman,H.J. e Torres,M. (2002). Reactive Oxygen Species and Cell Signaling. Respiratory Burst in Macrophage Signaling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 166:S4–S8.

- Forman,H.J., Fukuto,J., Torres,M. (2004) Signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species: pathways and chemical principles. Kluwer academic publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.
- Fothergill-Gilmore,L.A., Michels,P.A., (1993). Evolution of glycolysis. Prog. Biophys. Mol.Biol., 59: 105-235.
- Freitas,D.R.J., Rosa,R.M., Moraes,J., Campos,E., Logullo,C., Vaz-Jr,I., Masuda,A. (2007). Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). Comparative Biochemistry and Physiology. 146: 688–694.
- Gilbert,D.L., Gerschman,R., Ruhm,K.B., Price,W.E. (1957). The production of hydrogen peroxide by high oxygen pressures. Journal General Physiol. 41(5):989-1003.
- Gonzales, J.C. (1995). O controle do carrapato do boi. 2a ed. Porto Alegre. Edição do autor;
- Gonzales, J.C., Silva, N.R., Franco, N. (1974), A vida livre do *Boophilus microplus*. Arq. Fac. Vet. UFRGS. RG 3, 21-28;
- Gruning,N., Rinnerthaler,M., Bluemlein,K., Mulleder,M., Wamelink,M.M.C., Lehrach,H., Jakobs,C., Breitenbach,M., Ralser,M. (2011). Pyruvate Kinase Triggers a Metabolic Feedback Loop that Controls Redox Metabolism in Respiring Cells. Cell Metabolism. 14: 415-427.
- Halliwell,B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. Biochemical Society Transactions. 35(5):1147-1150.
- Holman, P.J., Ronald, N.C. (1980). A new tick cell line derived from *Boophilus microplus*. Res. Vet. Sci., 29:383–387.
- Indo,H.P., Davidson,M., Yen,H., Suenaga,S., Tomita,K., Nishii,T., Higuchi,M., Koga,Y., Ozawa,T., Majima,H.J. (2007). Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. Mitochondrion, 7:106–118.
- Indo,H.P., Davidson,M., Yen,H., Suenaga,S., Tomita,K., Nishii,T., Higuchi,M., Koga,Y., Ozawa,T., Majima,H. (2007). Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage. Mitochondrion. 7: 106-118.

- Jongejan, F. and Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129:S3-S14.
- Keirans, J.E. (1992). Systematics of the Ixodida (Argasidae, Ixodidae, Nuttalliellidae): An overview and some problems. In *Tick Vector Biology. Medical and Veterinary Aspects* 1-24;
- Keirans, J.E. e Robbins, R.G. (1999). A word checklist of genera, subgenera, and species of ticks (Acari: Ixodida) published from 1973-1997. *J Vector Ecol.* 24, 115-129;
- Klotz, L. (2002). Oxidant-Induced Signaling: Effects of Peroxynitrite and Singlet Oxygen. *Review Biol. Chem.*, 383:443- 456.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS.* 416: 15-18.
- Kresge, N., Simoni, R.D., Hill, R.L. (2005). 100 years of biochemistry and molecular biology (JBC Centennial, 1905-2005), Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. *J. Biol. Chem.* 280.
- Kumar, J.S., Suman, S., Singh, V., Chandna, S. (2012). Radioresistant Sf9 insect cells display moderate resistance against cumene hydroperoxide. *Mol. Cell Biochem.* 367:141–151.
- Li, Z., Liu, J., Hu, J., Li, X., Wang, S., Yia, D., Zhao, M. (2012). Protective effects of hyperoside against human umbilical vein endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *Journal of Ethnopharmacology.* 139: 388-394.
- Mattila, J.T., Burkhardt, N.Y., Hutcheson, H.J., Munderloh, U.G. and Kurtti, T.J. (2007). Isolation of cell lines and a rickettsial endosymbiont from the soft tick *Carios capensis* (Acari: Argasidae: Ornithodorinae). *Journal of Medical Entomology,* 44:1091.
- Mattos, I.L., Shiraishi, K.A., Braz, A.D., Fernandes, J.R. (2003). Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. *Quim. Nova.* 26:373-380.
- Maya-Monteiro, C.M., Alves, L.R., Pinhal, N., Abdalla, D.S., Oliveira, P.L. (2000) HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J Biol Chem.* 275: 36584-9.
- Moraes, J., Galina, A., Alvarenga, P.H., Rezende, G.L., Masuda, A., Vaz Jr, I.S., Logullo, C. (2007). Glucose metabolism during embryogenesis of hard tick *B. microplus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 146:528-533.

- Munderloh,U.G. and Kurtti,T.J. (1989). Formulation of medium for tick cell culture. *Exp.Appl.Acarol.*, 7:219-229.
- Nari, A. (1995). Strategies for the control of one-host ticks and relationship with tick-borne diseases in South America. *Vet. Parasitol.*, 57, 153-165;
- Nijhof,A.M., Balk,J.A., Postigo,M., Jongejan,F. (2009). Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. *BMC Molecular Biology*, 10:112.
- Niwa,K., Inanami,O., Yamamori,T., Ohta,T., Hamasu,T., Kuwabara,M. (2003). Redox Regulation of PI3K/Akt and p53 in Bovine Aortic Endothelial Cells Exposed to Hydrogen Peroxide. *Antioxidants e redox signaling*. 5(6): 713-722.
- Oliveira,M.F., Silva,J.R., Dansa-Petretski,M., De Souza,W., Lins,U., Braga,C.M., Masuda,H., Oliveira,P.L. (1999). Haem detoxification by an insect. *Nature*. 400: 517-518.
- Oliveira,P.L., Kawooya,J.K., Ribeiro,J.M., Meyer,T., Poorman,R., Alves,E.W., Walker,F.A., Machado,E.A., Nussenzveig,R.H., Padovan,G.J., Masuda,H.A. (1995). heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Isolation and characterization. *J Biol Chem*. 270(18): 10897-901.
- Paiva-Silva,G.O., Cruz-Oliveira,C., Nakayasu,E.S., Maya-Monteiro,C.M., Dunkov,B.C., Masuda,H., Almeida,I.C., Oliveira, P.L. (2006). A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *PNAS*. 103(21): 8030-8035.
- Parker,J.D., Parker,K.M., Keller,L. (2004). Molecular phylogenetic evidence for an extracellular Cu Zn superoxide dismutase gene in insects. *Insect Molecular Biology*, 13: 587–594.
- Pereira,L.O., Oliveira,P.L., Almeida,I.C., Paiva-Silva,G.O. (2007). Biglutaminylbiliverdin IX alpha as a heme degradation product in the dengue fever insect-vector *Aedes aegypti*. *Biochemistry*. 46:6822-6829.
- Pfaffl,M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29:2002-2007.
- Pramanik,K.C., Boreddy,S.R., Srivastava,S.K. (2011). Role of Mitochondrial Electron Transport Chain Complexes in Capsaicin Mediated Oxidative Stress Leading to Apoptosis in Pancreatic Cancer Cells. *Plos one* 6(5): e20151.
- Rhee,S.G., (2006). H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science*. 312:1882.

- Rombough,P. (2011). The energetics of embryonic growth. *Respir Physiol Neurobiol.* 178:22-29.
- Sadidi,M., Lentz,S.I., Feldman,E.L. (2009). Hydrogen peroxide-induced Akt phosphorylation regulates Bax activation. *Biochimie.* 91:577-585.
- Sanches,J.A.G., Nardy,M.B.C., Stella,M.B. (2012). Bases da bioquímica e tópicos de biofísica: um marco inicial. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Santiago,A.P.S.A., Chaves,E.A., Oliveira,M.F., Galina,A. (2008) Reactive oxygen species generation is modulated by mitochondrial kinases: Correlation with mitochondrial antioxidant peroxidases in rat tissues. *Biochimie.* 90: 1566-1577.
- Sanz,A., Trenzado,C.E., López-Rodríguez,M.J., Furné,M.J., Figueroa,J.M.T. (2010). Study of Antioxidant Defense in Four Species of Perloidea (Insecta, Plecoptera). *Zoological Science*, 27: 952–958.
- Schwartz,A.G. e Pashko,L.L. (2004). Dehydroepiandrosterone, glucose-6 phosphate dehydrogenase, and longevity. *Ageing Research Reviews.* 3: 171-187.
- Schwartz,A.G., Pashk,L.L. (2004). Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity. *Ageing Research Reviews.* 3: 171-187.
- Seifert,G.W., Springell,P.H., Tatchel,I.R.J. (1968). Radiactive studies on the feeding of larve, nymphs and adults of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Parasitology.* 58:415-430.
- Stone,J.R. e Yang,S. (2006). Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxidants and Redox Signaling.* 8:243-270.
- Sutherst,R.W., Maywald,G.F., Kerr,J.D., Siegeman,D.A. (1983). The effect of the cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research.* 34:317-327.
- Tavender,T.J. e Bulleid,N.J. (2010). Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H₂O₂ produced during disulphide formation. *Journal of Cell Science.* 123: 2672-2679.
- Tian,W., Braunstein,L.D., Apse,K., Pang,J., Rose,M., Tian,X., Stanton,R.C. (1999). Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *American Journal of Physiology, Cell Physiology.* 276: C1121-C1131.
- Tian,W., Braunstein,L.D., Pang,J., Stuhlmeier,K.M., Xi,Q., Tian,X., Stanton,R.C. (1998). Importance of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity for Cell Growth. *The Journal of Biological Chemistry.* 273: 10609-10617.

- Umemiya,R., Matsuo,T., Hatta,T., Sakakibara,S., Boldbaatar,D., and Fujisaki,K. (2008). Autophagy-related genes from a tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Autophagy*, 4:79-81.
- Varma,M.G.R.; Pudney,M.; Leaky,C.J. (1975). The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arbovirusis. *J. Med. Entomol.*, 11:698-706.
- Wolpert,L., Beddington,R., Brockes,J., Jessel,T., Lawrence,P., Meyerowitz,E. (2000). Princípios de biologia do desenvolvimento. Trad.Henrique Bunselmeyer Ferreira. Artes Médicas Sul. Porto Alegre.
- Worthington, C.C. (1988). Worthington Enzyme Manual: Enzymes and Related Biochemicals. Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey.
- Wu,R., Wyatt,E., Chawla,K., Tran,M., Ghanefar,M., Laakso,M., Epting,C.L., Ardehali,H. (2012). Hexokinase II knockdown results in exaggerated cardiac hypertrophy via increased ROS production. *EMBO Mol Med.* 4: 633-646.
- Zhang,Z., Liew,C.W., Handy,E.D., Zhang,Y., Leopold,J.A., Hu,J., Guo,L., Kulkarni,R.N., Loscalzo,J., Stanton,R.C. (2010). High glucose inhibits glucose-6 phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and cell apoptosis. *FASEB J.* 24, 1497–1505.
- Zhao,H., Kalivendi,S., Zhang,H., Joseph,J., Nithipatikom,K., Vásquez-Vivar,J., Kalyanaraman,B. (2003). Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free radical biology and medicine.* 34(11):1359-1368.

ANEXOS



Anexo 1

Componentes do Meio Leibovitz (Sigma)



L-15 MEDIUM LEIBOVITZ

With L-glutamine

Product Number **L4386**

Product Description

L-15 Medium (Leibovitz) was originally formulated for use in carbon dioxide (CO₂) free systems requiring sodium bicarbonate. L-15 is buffered by its complement of salts, free base amino acids and galactose substituted for glucose to help maintain physiological pH control.

Components	g/L
Calcium Chloride (anhydrous)	0.1396
Magnesium Chloride (anhydrous)	0.09366
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767
Potassium Chloride	0.4
Potassium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.06
Sodium Chloride	8.0
Sodium Phosphate Dibasic (anhydrous)	0.19
L-Alanine	0.225
L-Arginine (free base)	0.5
L-Asparagine (anhydrous)	0.25
L-Cysteine (free base)	0.12
L-Glutamine	0.3
L-Glycine	0.2
L-Histidine	0.25
L-Isoleucine	0.125
L-Leucine	0.125
L-Lysine Monohydrochloride	0.0937
L-Methionine	0.075
L-Phenylalanine	0.125
L-Serine	0.2
L-Threonine	0.3
L-Tryptophan	0.02
L-Tyrosine (free base)	0.3
L-Valine	0.1
Choline Chloride	0.001
Flavin Mononucleotide•Na	0.0001
Folic Acid	0.001
myo-Inositol	0.002
Niacinamide	0.001
DL-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.001
Pyridoxine•HCl	0.001
Thiamine Monophosphate•HCl	0.001
D-Galactose	0.9
Phenol Red•Na	0.011
Pyruvic Acid•Na	0.55

Precautions and Disclaimer

REAGENT

For R&D use only. Not for drug, household or other uses.

Preparation Instructions

Powdered media are hygroscopic and should be protected from moisture. The entire contents of each package should be used after opening. Preparing a concentrated solution of medium is not recommended as precipitates may form.

Supplements can be added prior to filtration or introduced aseptically to sterile medium.

1. Measure out 90% of final required volume of water. Water temperature should be 15-20 °C.
2. While gently stirring the water, add the powdered medium. Stir until dissolved. Do NOT heat.
3. Rinse original package with a small amount of water to remove all traces of powder. Add to solution in step 2.
4. While stirring, adjust the pH of the medium to 0.1-0.3 pH units below the desired pH since it may rise during filtration. The use of 1N HCl or 1N NaOH is recommended.
5. Add additional water to bring the solution to final volume.
6. Sterilize immediately by filtration using a membrane with a porosity of 0.22 microns.
7. Aseptically dispense medium into sterile container.

Storage and Stability

Store the dry powdered medium at 2-8 °C under dry conditions and liquid medium at 2-8 °C in the dark.

Deterioration of the powdered medium may be recognized by any or all of the following: [1] color change, [2] granulation/clumping, [3] insolubility. Deterioration of the liquid medium may be recognized by any or all of the following: [1] pH change, [2] precipitate or particulates, [3] cloudy appearance [4] color change. The nature of supplements added may affect storage conditions and shelf life of the medium. Product label bears expiration date.

Procedure

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

Water for tissue culture use [W3500]

1N Hydrochloric Acid [H9892]

1N Sodium Hydroxide [S2770]

Medium additives as required

Reference

- 1 Leibovitz, A. (1963). The growth and maintenance of tissue/cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Amer. J. Hyg.* 78:173-180.

Revised: May 2007

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

Anexo 2

Preparação do Meio L-15 concentrado (Munderloh e Kurtti, 1989).

Dissolver o conteúdo L-15 (Sigma®) (para 1 litro de meio) em 900 ml de água estéril e em seguida adicionar:

Ácido L-Aspártico	299mg
Ácido L-Glutamínico	500mg
L-Prolina	300mg
Ácido α -cetoglutâmico	299mg
L-Glutamina	292mg
d-Glicose	14410mg
Solução de Vitaminas *	1 ml
Solução de Minerais **	1 ml

Manter o recipiente envolto em papel alumínio. Dissolver os ingredientes sob leve agitação, por 90 minutos. Ajustar o pH para 6,2. Completar volume para 1 litro e filtrar em membrana de 0,22 μ m. Estocar por até 2 meses a 4°C (ao abrigo da luz).

*Obs. Preparo de solução de vitaminas:

Ingredientes	Peso (mg/100ml)
Ácido p-aminobenzóico	100
Cianocobalamina	50
d-biotina	10

****Obs. Preparo de solução de minerais:**

Ingredientes	Peso (mg/100ml)
Solução A:	
CoCl 6H ₂ O	20
CuSO ₄ 5H ₂ O	20
MnSO ₄ H ₂ O	160
ZnSO ₄ 7H ₂ O	200
Solução B:	
NaMoO ₄ 2H ₂ O	20
Solução C:	
Na ₂ SeO ₃	20
Solução D:	
Glutationa Reduzida	1000
Ácido ascórbico	1000
FeSO ₄ 7H ₂ O	50
Solução A	1 ml
Solução B	1 ml
Solução C	1 ml

Os ingredientes das soluções devem ser dissolvidos em água estéril na ordem em que foram listadas e o volume de cada solução deve ser completado para 100 ml.

Anexo 3

Gene alvo	Primers	Amplicon (pb)*
Hexoquinase	HK-Bm-qpcr-for: CATGGACAAAGAGCTTCAACTGCTC HK-Bm-qpcr-rev: GGAAAGCTCCCTTGACCAGGGTA	150
Piruvato kinase	Pyruki-Bm-qpcr-for: GGGCAAGAGGGCAAGACAACCTG Pyruki-Bm-qpcr-rev: CACGTTGAGCACCTTGGTGATG	141
PEPCK	PEPCK-Bm-qpcr-for: CATTGACTGGATCTGCCGCCG PEPCK-Bm-qpcr-rev: TCGCTGCATTCTGAAGCCAG	171
G6PDH	G6PDH-Bm-qpcr-for: CGCAACGAATTGGTATTGAGG G6PDH-Bm-qpcr-rev: CGACTGCCATAGGTGAGATCC	122
Catalase	CAT-Bm-qpcr-for: GAGGAGAGGGACCGCCTTAC CAT-Bm-qpcr-rev: GTGCCTTGGTGAAGTTCGTG	97

*(pb): pares de base