

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

GUSTAVO ANTÔNIO PERARDT FARIAS

**PERFIL ELETROFORÉTICO DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL E
PERIFÉRICO DE BARATAS *Phoetalia pallida***

**São Gabriel
2014**

GUSTAVO ANTÔNIO PERARDT FARIAS

**PERFIL ELETROFORÉTICO DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL E
PERIFÉRICO DE BARATAS *Phoetalia pallida***

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Lúcia Helena do Canto Vinadé

**São Gabriel
2014**

GUSTAVO ANTÔNIO PERARDT FARIAS

**PERFIL ELETROFORÉTICO DE SISTEMA NERVOSO CENTRAL E
PERIFÉRICO DE BARATAS *Phoetalia pallida*.**

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, Campus São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: / /

Banca examinadora:

Profa. Dra. Lúcia Helena do Canto Vinadé
Orientadora
UNIPAMPA

Prof. Dr. Chariston André Dal Belo
UNIPAMPA

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo
UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado me apoiando nas decisões e sempre acreditaram em mim, além da educação exemplar não mediram esforços para concretizar mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por me proporcionar mais uma vitória em minha vida.

Aos meus pais, não tenho palavras para descrever esse sentimento de dever cumprido. Vocês não mediram esforços para essa conquista passamos por muita coisa, mas sempre juntos, jamais deixaram eu desanimar e eu tenho certeza que não teria conseguido sem o apoio e a compreensão de vocês.

Aos meus professores pelos esforços de passarem o conhecimento necessário para eu me tornar um profissional competente.

A minha orientadora Lúcia pela dedicação, paciência e por aceitar esse desafio, sei que não foi fácil.

Ao Carlos que sempre esteve disposto a me ajudar, e foi fundamental para realizar esse trabalho.

Aos meus amigos e amigas que me apoiaram e me incentivaram, tanto os de longa data quanto os que conheci em São Gabriel, sem vocês seria impossível manter o foco e realizar essa etapa.

Aos meus familiares que sempre souberam do meu potencial e tinham certeza que esse dia iria chegar.

A minha irmã pelo exemplo, isso mesmo, mais nova e já formada eu sei o quanto é difícil, mas valeu a pena.

Enfim, a todos que me ajudaram de alguma forma nessa caminhada.

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho
mais certo de vencer é tentar mais uma vez”.

Thomas Edison

RESUMO

Algumas proteínas de sistema nervoso em insetos possuem estrutura e regulação homóloga às apresentadas nos organismos vertebrados e, portanto, é válido estudar a neurotransmissão em insetos, ainda que a macroestrutura e a fisiologia dos sistemas difiram entre os dois reinos. Dentre os insetos, a pesquisa das proteínas de receptores para neurotransmissores está mais a frente em moscas *Drosophila melanogaster* do que em baratas. Porém, é crescente o uso de baratas em pesquisas neurobiológicas, principalmente pela simplicidade e economicidade destes insetos como modelos experimentais, ainda sem restrições legais com relação à experimentação científica. O presente trabalho teve como objetivo obter o perfil eletroforético das proteínas do sistema nervoso central e periférico de baratas da espécie *Phoetalia pallida*. O trabalho iniciou com uma minuciosa revisão da literatura a fim de obter-se as informações básicas sobre o sistema nervoso de insetos, tendo como parâmetro alguns sistemas de neurotransmissores de mamíferos. Para este estudo, o gânglio subesofágico foi usado como estrutura representativa de sistema nervoso central e o terço proximal das pernas posteriores, as coxas, como representativo da junção neuromuscular (sistema nervoso periférico). Estas estruturas foram dissecadas, homogeneizadas e solubilizadas em detergente SDS ou Triton X-100. Alíquotas de frações subcelulares (homogenato total, sobrenadante e pellet) foram colhidas para quantificação das proteínas através do método de BCA - ácido bicinconínico. Após essa etapa, foram conduzidos experimentos de eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), obtendo-se o perfil proteico das frações. Com isto, pretende-se, através da comparação da massa molecular e migração eletroforética, sugerir alguns dos receptores presentes no sistema nervoso de baratas, baseando-se nos receptores já conhecidos e classificados de mamíferos e de *Drosophilas*.

Palavras-chave: receptor, neurotransmissor, barata, sistema nervoso

ABSTRACT

Some proteins in the insect nervous system have the structure and the regulation homologous to vertebrate organisms, therefore it is valid to study neurotransmission in insects, albeit the physiology and the macrostructure of the systems differ between the two kingdoms. Among insects, the study of protein receptors for neurotransmitters is more advanced in *Drosophila melanogaster* flies than in cockroaches. However, the use of cockroaches in neurobiological research is increasing, mainly because of the simplicity and economy of these insects as experimental models, with yet no legal restrictions on scientific experimentation. The present study aimed to obtain the electrophoretic profile of proteins from central and peripheral nervous system of cockroach species *Phoetalia pallida*. The work started with a comprehensive review of the literature in order to obtain basic information about the nervous system of these insects, using as parameter some neurotransmitter systems from mammals. In this study the suboesophageal ganglion was used as a representative structure of the central nervous system and the proximal third from the posterior legs, thighs, used as a representative structure of the neuromuscular junction (peripheral nervous system). These structures were dissected, homogenized and solubilized in detergents SDS or Triton X-100. Aliquots of subcellular fractions (total homogenate supernatant and pellet) were collected for quantitation of proteins estimated by BCA method –bicinchoninic acid. After this step, was conducted one dimension polyacrylamide gel electrophoresis (SDS- PAGE), yielding the protein profile of the fractions. With this we intended, by comparing the molecular weight and the electrophoretic mobility pattern of known mammalian and *Drosophila* receptors, to suggest some of the receptors present in the nervous system.

Keywords: receptor, neurotransmitter, cockroach, nervous system

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Phoetalia pallida.....	14
Figura 2: Partes de um neurônio.....	15
Figura 3: Componentes da sinapse química.....	17
Figura 4: Sistema de liberação de um neurotransmissor.....	18
Figura 5: Gânglio subesofágico.....	25
Figura 6: Junção neuromuscular.....	25
Figura 7: Princípio do método de BCA.....	27
Figura 8: Protocolo utilizado para a dosagem de proteínas.....	27
Figura 9: Representação de uma curva para dosagem de proteínas.....	29
Figura 10: Absorbâncias das amostras de Junção Neuromuscular.....	29
Figura 11: Valores de concentração de proteínas em amostras de JN.....	30
Figura 12: Perfil eletroforético de gânglio subesofágico.....	31
Figura 13: Perfil eletroforético de junção neuromuscular.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais neurotransmissores.....	19
Tabela 2: Valores de massa molecular de receptores.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA – Ácido α - amino- 3-hidroximetil-4-isoxazolepropionico

BCA – Ácido bicinconínico

CAT – Colina acetiltransferase

CMC – Concentração miscelar crítica

GABA – Ácido gama aminobutírico

JN – Junção neuromuscular

kDa – quilo Dalton

nm – Nanômetro

NMDA – N-metil-D-aspartato

SDS-PAGE – eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida e SDS

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SN – Sistema nervoso

SNC – Sistema nervosa central

SNP – Sistema nervoso periférico

TX-100 – Triton X-100

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Insetos.....	13
1.2. Sistema nervoso - Características.....	14
1.3. Detergentes.....	22
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral.....	24
2.2. Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAS E MÉTODOS	24
3.1. Animais e estruturas.....	24
3.2. Homogeneização e solubilização das estruturas.....	26
3.3. Dosagem de proteínas.....	26
3.4. Eletroforese.....	27
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	28
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS e PERSPECTIVAS	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

A transmissão nervosa em insetos ainda é pouco estudada e mínima informação existe sobre os receptores para os neurotransmissores, como por exemplo, quais são exatamente estes e onde estão localizados. O presente trabalho pretende contribuir na elucidação dos mecanismos de neurotransmissão de insetos, tendo como modelo experimental as baratas da espécie *Phoetalia pallida*, e através do estudo do perfil eletroforético de duas estruturas representativas de sistema nervoso.

1.1 Insetos

Os insetos fazem parte do grupo dos artrópodes, ou seja, o grupo dos invertebrados que possuem patas articuladas. Os artrópodes possuem uma carapaça protetora externa formada por uma substância resistente e impermeável, chamada quitina, endurecida por conter muito carbonato de cálcio. Dentro da classificação dos artrópodes, os insetos se encontram no grupo que possui seis patas distribuídas em três partes. Apresentam o corpo subdividido em cabeça, tórax e abdome. Possuem um par de antenas e três pares de patas no tórax. Na maioria das espécies, há dois pares de asas, mas há espécies com apenas um par e outros sem asas. São os mais abundantes de todos os organismos, correspondendo a 80% de todas as espécies de animais descritas.

Baratas como modelo experimental

As baratas são insetos hemimetábolos, ou seja, apresentam metamorfose incompleta, do tipo paurometabólica (os imaturos e adultos vivem no mesmo hábitat), passando pelos estágios de ovo, ninfa (correspondente à fase larval) e adulto, com a ausência do estágio imóvel (pupa). A fêmea produz uma cápsula protetora dos ovos (ooteca), em forma de bolsa fechada. O número de ovos varia com a espécie, podendo chegar até 50 ovos.

A facilidade de criação associada ao baixo custo e ao elevado potencial reprodutivo são algumas das características que fazem as baratas (Figura 1)

serem bastante utilizadas na pesquisa, além da não restrição de uso quanto às normas legais para animais em laboratório.

A neurotransmissão em baratas ainda é pouco conhecida, tornando-se um foco de estudo a ser explorado.

Figura 1 – *Phoetalia pallida*



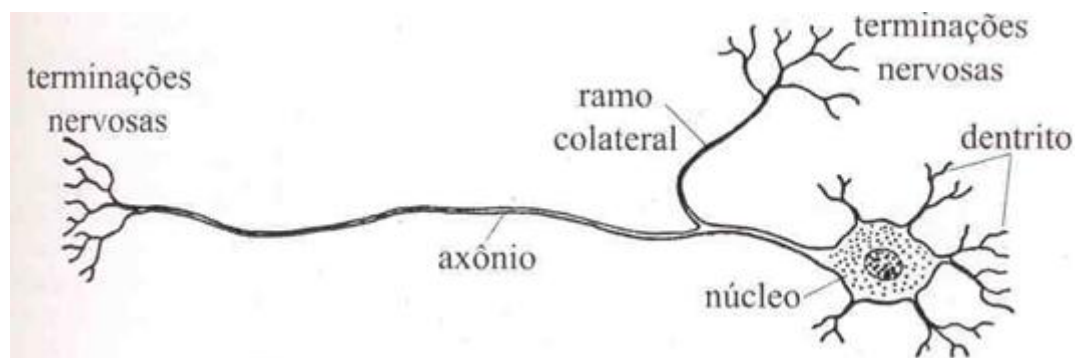
Fonte - <http://kverko.com/2013/tarakany>

1.2 Sistema Nervoso – Características

O sistema nervoso (SN) é responsável pelo ajuste do organismo ao ambiente. Sua função é perceber e identificar as condições ambientais externas, bem como as condições dentro do próprio corpo e elaborar respostas que se adaptem a essas condições através da transmissão do impulso nervoso. A transmissão do impulso nervoso no sistema nervoso central (SNC) se processa no contato neurônio-neurônio. Nos mamíferos, este contato acontece em todo o encéfalo e na medula espinhal. Da medula espinhal partem os neurônios eferentes (motores) e aportam os neurônios aferentes (ou sensoriais), que em conjunto constituem o sistema nervoso periférico (SNP). No sistema nervoso periférico, a transmissão entre neurônio e músculos acontece através da junção neuromuscular (JN).

A principal célula no sistema nervoso é o neurônio (Figura 2), constituído de soma, dendrito e axônio. A condução nervosa iniciada num dendrito é integrada no soma, passa ao axônio e deste para um dendrito de outro neurônio, produzindo enfim uma resposta específica.

Figura 2 - Partes de um neurônio.



Fonte: Snodgrass, 1993

Nos insetos, o sistema nervoso central é formado por três estruturas: cérebro, gânglio subesofágico e cordão ventral. O cérebro também chamado de gânglio supraesofágico é dividido em três partes: protocérebro, deutrocérebro e tritocérebro. O cérebro está unido ao gânglio subesofágico e deste parte o cordão nervoso ventral. O sistema nervoso visceral inerva os órgãos internos e o sistema periférico, que possui função de inervar os músculos e os órgãos dos sentidos, completa o sistema nervoso dos insetos.

A musculatura dos insetos está relacionada com a movimentação e locomoção, atuando diretamente sobre o exoesqueleto, partes internas e seus apêndices. Segundo Gallo et al (2002) histologicamente, são músculos do tipo estriado e podem ser de três tipos:

- a) Músculos fásicos: realizam contrações rápidas e estão presentes nas asas e patas;
- b) Músculos do exoesqueleto: realizam o movimento de expansão e retração durante a respiração, entre os segmentos corporais;
- c) Músculos viscerais: atuam nos órgãos internos dos insetos.

A transmissão do impulso nervoso ocorre através de áreas de contato chamadas sinapses, por via elétrica ou química e os principais íons envolvidos na transmissão são o sódio (Na^+), o potássio (K^+) e o cloro (Cl^-).

Sinapses

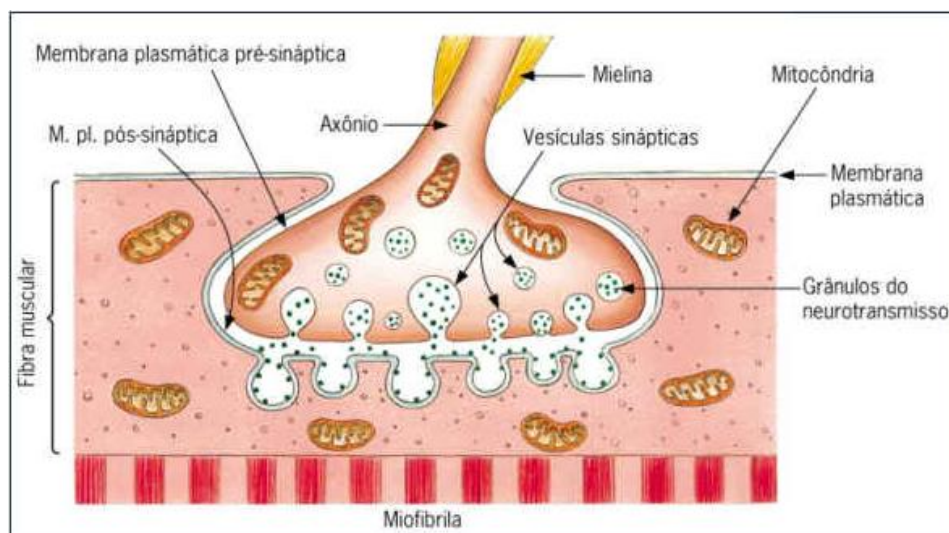
As sinapses compreendem as comunicações que os neurônios realizam entre si. Duas características diferenciam as células nervosas das outras do organismo: capacidade de conduzir sinais bioelétricos por longas distâncias sem que haja enfraquecimento do impulso ao longo de seu percurso e também por apresentarem, além de conexões com as células nervosas, conexões com células musculares e glandulares. Existem dois tipos de sinapses. As elétricas e as químicas.

Sinapses elétricas consistem na troca de informações entre as células, onde ocorre transferência de corrente iônica diretamente de uma célula para outra, através de sítios especializados chamados junções *gap* ou junções comunicantes. Nas junções comunicantes, as membranas ficam muito próximas e possuem canais iônicos que permitem a passagem dos íons. Dessa forma, as células se acoplam quimicamente. Quando uma célula entra em atividade, ou seja, produz potenciais, a corrente iônica passa diretamente para a outra célula pelas junções comunicantes. O fluxo dessas sinapses é bidirecional e sua transmissão é muito mais rápida quando comparada com a sinapse química. A importância da sinapse elétrica está em permitir a sincronização de numerosas populações celulares acopladas, devido à rapidez de sua transmissão.

Sinapses químicas compreendem a comunicação entre os neurônios com outros neurônios ou com células efetoras por meio de um mediador químico, denominado neurotransmissor (Figura 3 e 4). Os neurotransmissores são sintetizados pelos próprios neurônios e armazenados dentro de vesículas, que são pequenas organelas esféricas delimitadas por membranas, cada qual com um diâmetro aproximado de 50 nanômetros (nm). Essas vesículas concentram-se no terminal axônico e quando os impulsos nervosos chegam a esses terminais os neurotransmissores são liberados por meio de exocitose. A membrana do terminal nervoso que libera os neurotransmissores denomina-se

membrana pré-sináptica e a imediatamente vizinha, membrana pós-sináptica. Entre elas há um espaço em torno de 20 a 40 nm chamado fenda sináptica. A interação dos neurotransmissores com a membrana pós-sináptica é realizada por meio de receptores protéicos altamente específicos.

Figura 3 - Componentes de sinapse química em junção neuromuscular de mamífero.



Fonte: CÉSAR & CEZAR. Biologia 2. São Paulo, Ed Saraiva, 2002

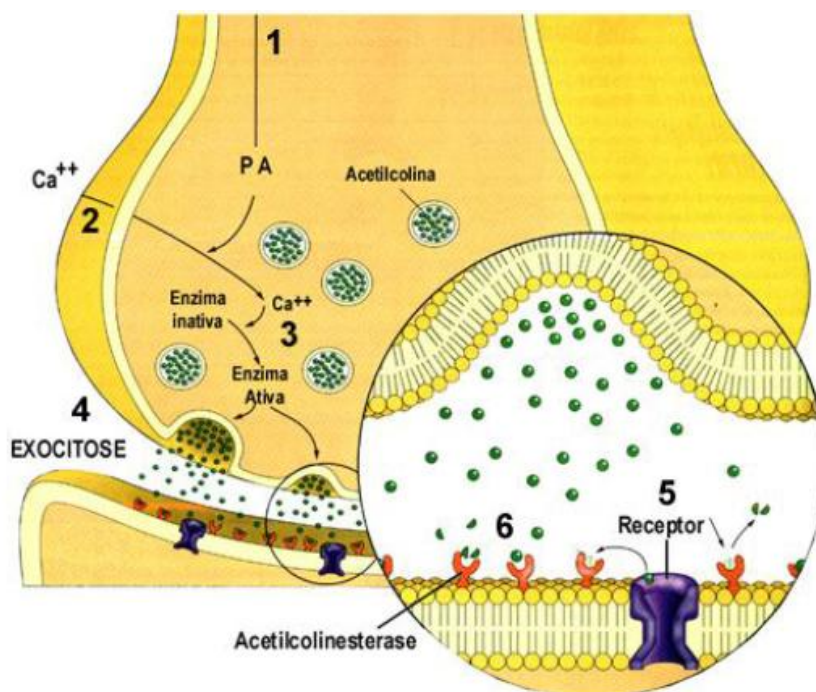
Sistema de Neurotransmissores

O neurotransmissor é o agente químico responsável pela informação levada por longas distâncias ao longo dos nervos. O neurotransmissor necessita ligar-se a um receptor específico para realizar a comunicação da célula pré-sináptica até a pós-sináptica.

Ao longo dos anos, neurocientistas estabeleceram certos critérios que devem ser seguidos para que uma molécula possa ser considerada um neurotransmissor. A molécula deve ser sintetizada e estocada no neurônio pré-sináptico e, devido ao estímulo deve ser liberada pelo terminal do axônio pré-sináptico e por fim deve produzir uma resposta na célula pós-sináptica que mimetiza a resposta produzida pela liberação do neurotransmissor do neurônio pré-sináptico.

Na figura 4 é demonstrado como ocorre o mecanismo da neurotransmissão química, tendo como exemplo o neurotransmissor acetilcolina.

Figura 4 – Sistema de liberação de um neurotransmissor (NT). Com a chegada do potencial de ação (PA) no terminal (1), os canais de Ca^{++} dependentes de voltagem abrem-se e ocorre a difusão de Ca^{++} para o interior do terminal (2). O aumento de Ca^{++} intracelular estimula a exocitose dos NT para a fenda sináptica (3, 4). Os NT ligam-se a receptores da membrana pós-sináptica (5) e causam mudanças de permeabilidade iônica. O fluxo resultante de íons muda o potencial de membrana pós-sináptico transitoriamente, causando uma resposta pós-sináptica. Os NT por outro lado, são inativados por enzimas específicas (6).



Fonte: Departamento de Fisiologia, IB Unesp-Botucatu Profa. Sílvia M. Nishida

A maioria dos neurotransmissores situa-se em uma de três categorias: aminoácidos, aminas e peptídeos. Alguns representantes destas categorias são mostrados na figura abaixo (Tabela 1). Os neurotransmissores aminoácidos e aminas são pequenas moléculas orgânicas com pelo menos um átomo de nitrogênio armazenadas em vesículas sinápticas. Os neurotransmissores peptídicos constituem-se de grandes moléculas

armazenadas em de grânulos secretores. Grânulos secretores e vesículas sinápticas são observados com freqüência nos mesmos terminais axonais.

Tabela 1- Principais neurotransmissores.

Aminoácidos	Aminas	Peptídeos
Ácido gama-amino-butirico (GABA)	Acetilcolina (ACh)	Endorfinas
Glutamato (Glu)	Dopamina	Encefalinas
Glicina (Gli)	Epinefrina	Somatostastina
	Histamina	Substância P
	Noradrenalina	
	Serotonina	

Fonte: Autor.

Os neurotransmissores são sintetizados a partir dos sistemas enzimáticos presentes nos terminais axônicos ou no corpo celular. Os aminoácidos, por exemplo, são sintetizados em todas as células a partir da glicose ou de proteínas decompostas. A única exceção é o ácido gama aminobutírico (GABA) que é sintetizado a partir do glutamato por determinados neurônios. As aminas são todas sintetizadas no terminal sendo que a acetilcolina é sintetizada a partir da colina; a serotonina, a partir do triptofano e as catecolaminas (dopamina, adrenalina e noradrenalina), a partir da tirosina.

Características dos principais neurotransmissores:

A acetilcolina foi o primeiro neurotransmissor a ser identificado, sendo que a maioria dos elementos necessários para o funcionamento das sinapses colinérgicas foi identificada nos insetos. A colina acetiltransferase (CAT) é a enzima responsável por sua síntese, enquanto que a acetilcolinesterase (ACE) é responsável pela sua degradação. A acetilcolina interage com receptores colinérgicos muscarínicos ou nicotínicos induzindo alterações na permeabilidade da membrana levando a respostas celulares.

GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC em vertebrados (Bloom e Iversen, 1971). É produzido pela remoção enzimática de um grupo carboxílico do ácido glutâmico. Embora o GABA possa ser um neurotransmissor de sistemas de projeção axônica longa, ele é principalmente encontrado em interneurônios.

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no sistema nervoso central dos vertebrados (Monaghan et al, 1989), porém existem boas evidências de que o glutamato é um transmissor estimulador em muitas junções neuromusculares de artrópodes (Shinozaki, 1988), ou seja atua no sistema periférico dos insetos diferentemente dos mamíferos.

Existem três classes de receptores de glutamato do tipo ionotrópico, e todas foram nomeadas de acordo com seu agonista farmacológico seletivo. São elas: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hidroximetil-4-isoxazolepropionico) e cainato. A afinidade pelo glutamato é diferente entre esses receptores, sendo geralmente maior nos receptores do tipo NMDA (Dingledine, 1999).

Receptores para Neurotransmissores

Os neurotransmissores quando liberados dentro da fenda sináptica afetam os neurônios pós-sinápticos por se ligarem a proteínas receptoras específicas que estão embutidas nas densidades pós-sinápticas. Embora haja bem mais de 100 diferentes receptores para neurotransmissores, eles podem ser divididos em dois tipos: canais iônicos ativados por neurotransmissores e receptores acoplados a proteínas G.

Os receptores ionotrópicos possuem sítios de recepção para os neurotransmissores localizados em um canal iônico. Quando o neurotransmissor se liga ao sítio do receptor ocorre uma mudança de conformação espacial resultando na abertura (ou fechamento) do poro iônico.

Já os receptores metabotrópicos, são moléculas que possuem sítios para os neurotransmissores que não são canais iônicos. A formação do complexo neurotransmissor-receptor inicia reações bioquímicas que resulta na abertura indireta dos canais iônicos. Nesse caso o receptor pós sináptico ativa uma proteína reguladora chamada proteína G que vai acionar uma outra

proteína chamada efetora que de fato, poderá mudar a conformação de um canal iônico ou, então, ativar uma enzima chave que modifica o metabolismo do neurônio pós-sináptico. Esses tipos de receptores ativam uma reação em cascata e usam um segundo mensageiro (o primeiro é o neurotransmissor). Assim, nas sinapses em que os neurotransmissores agem diretamente sobre receptores ionotrópicos, a neurotransmissão é bastante rápida e nas sinapses mediadas por receptores metabotrópicos a comunicação é mais lenta.

Uma vez que os neurotransmissores liberados tenham interagido com receptores pós-sinápticos, eles devem ser removidos da fenda sináptica para permitir um novo ciclo de transmissão sináptica. Uma forma de isto acontecer seria por meio da simples difusão do neurotransmissor para longe da sinapse, entretanto, para a maioria dos neurotransmissores aminoácidos e aminas, isto ocorre pela sua recaptação para dentro do terminal pré-sináptico, que ocorre por ação de transportadores protéicos específicos para neurotransmissores presentes na membrana pré-sináptica. Uma vez dentro do citosol do terminal, os neurotransmissores podem ser degradados ou recarregados para o interior de vesículas sinápticas. Transportadores de neurotransmissores também existem na membrana da glia que envolve a sinapse, as quais auxiliam na remoção de neurotransmissores da fenda sináptica. Uma outra maneira de terminar a ação do neurotransmissor é pela degradação enzimática na própria fenda sináptica. É assim que a acetilcolina é removida da junção neuromuscular, por exemplo. A enzima acetilcolinesterase presente na fenda sináptica, cliva a molécula de acetilcolina, deixando-a inativa.

Os perfis de neurotransmissores de vários mamíferos tem sido examinados com cuidado no que diz respeito à distribuição, síntese, armazenamento, liberação e receptores específicos. Porém, em insetos, não se possui um perfil de neurotransmissão completo, por isso grande parte de estudos baseia-se na comparação com trabalhos em vertebrados. Um dos problemas é a caracterização dos receptores, já que as drogas com atividade em mamíferos apresentam um efeito farmacológico inesperado quando aplicado em insetos.

Para o estudo dos receptores de neurotransmissores muitas vezes faz-se necessário o isolamento da membrana plasmática e uma melhor solubilização destas proteínas é obtida quando detergentes são utilizados.

1.3 Detergentes

Geralmente detergentes são compostos orgânicos constituídos de uma porção carbônica hidrofóbica e um grupo hidrofílico carregado em sua extremidade, porém, existem os detergentes com ácidos inorgânicos que foram bastante utilizados na remoção de crostas endurecidas de equipamentos. Detergentes orgânicos são surfactantes suaves, ou seja, agentes que atuam na superfície, usados para romper a membrana das células e liberar o material intracelular na forma solúvel. Suas principais aplicações são: na quebra das interações proteína-proteína, proteína-lipídio e lipídio-lipídio; na desnaturação da estrutura proteica; evitando ligações não específicas em abordagens imunológicas e na cristalização de proteínas.

Baseada em suas características, os detergentes são classificados em três tipos: iônico (aniônico ou catiônico), zwitteriônico e não iônico. Detergentes iônicos são compostos de uma cadeia hidrofóbica e um grupo carregado em sua extremidade, podendo ser aniônico ou catiônico. Eles geralmente possuem alto valor de concentração miscelar crítica (CMC) em relação aos detergentes não iônicos, e são considerados fortes. Como exemplo temos o dodecil sulfato de sódio (SDS).

Dodecil sulfato de sódio (SDS) é um surfactante bem eficaz, consegue solubilizar quase todas as proteínas numa solução. Ele quebra as ligações não covalentes das proteínas, causando desnaturação, perda da conformação nativa e da função. Ele se liga as proteínas numa taxa de 1,4:1 m/m (ou taxa de um ânion de SDS para dois aminoácidos), ocultando a carga real da proteína e adicionando carga líquida negativa, independentemente de seu ponto isoelétrico (pI). Esta é a principal razão do SDS ser amplamente utilizado na eletroforese de géis desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Por isso ele não deve ser usado quando for necessário manter a proteína em sua forma nativa ou quando as interações proteína-proteína forem ser estudadas. Também deve-se levar em consideração que algumas propriedades dos tampões podem ser alteradas com o uso de detergente iônicos, como a variação da força iônica.

Detergentes não iônicos diferem dos iônicos em relação ao grupamento na extremidade da cadeia, que não possui carga e é hidrofílico. São considerados surfactantes suaves, pois quebram interações proteína-lipídio e lipídio-lipídio, porém não quebram interações proteína-proteína, e a maioria desses detergentes não desnaturam as proteínas. Dessa forma, as proteínas são solubilizadas e isoladas, porém mantêm sua forma nativa. Por apresentar esta vantagem, estes detergentes são escolhidos quando se quer isolar as proteínas de membrana. Triton X-100 é o exemplo mais característico de surfactante não iônico de escolha para a maioria das imunoprecipitações.

Todos os membros dessa família (Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P40, Igepal® CA-630) são bastante similares e diferem apenas no seu número médio (n) de monômeros por micela (9,6; 8,0; 9,0 e 9,5, respectivamente) e na sua distribuição de PEG (polietilenoglicol) no grupamento hidrofílico. O Triton X-100 é derivado de polioxietileno e contém um grupo alquilfenil hidrofóbico. Seu valor de CMC é baixo, portanto não é removido facilmente por diálise. Seu ponto nuvem é de 64°C - nessa temperatura é observada a separação de fases.

O isolamento de proteínas de membrana é de interesse especial, mas possui alguns problemas particulares: i) dificuldade de solubilizar em soluções aquosas, ii) a natureza da bicamada lipídica é complexa, iii) as proteínas podem ter domínios hidrofílicos e hidrofóbicos e, iv) tem baixo nível de expressão. O volume de tampão é bem importante para que haja quantidade de detergente suficiente para solubilizar todas as proteínas de membrana da amostra.

Em princípio, ao mudar a temperatura e a concentração de sal no tampão, pode-se alcançar uma solubilização efetiva das proteínas de membrana, tendo vantagem em relação à fase de separação. Nesse caso, a proteína da membrana cercada pela micela precipita com o detergente e as proteínas solúveis permanecem no sobrenadante.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi obter o perfil eletroforético das proteínas do sistema nervoso central e periférico de baratas da espécie *Phoetalia pallida*.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar a dissecação de gânglios subesofágicos e coxas de barata;
- Padronizar a dosagem de proteínas pelo método do BCA;
- Fazer eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida e SDS para separação das proteínas.
- Observar a migração eletroforética das estruturas de SNC e SNP
- Buscar as massas moleculares de receptores descritos para insetos e mamíferos em banco de dados de bioinformática e associar as proteínas verificadas no perfil eletroforético obtido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e estruturas

As baratas foram adquiridas da empresa Bicho Brasileiro (<http://www.bichobrasileiro.com.br/alimento.vivo/>) e, após a chegada ao laboratório foram acondicionadas em caixas de polipropileno forradas com maravalha autoclavada, especificamente para manter os insetos no biotério do Campus São Gabriel. Os animais foram mantidos em temperatura de 22 a 24°C e alimentados *ad libitum* com ração canina ou felina triturada e água potável.

Para retirada das estruturas as baratas foram inicialmente colocadas a -20°C por 10 minutos para imobilização e anestesia. Para o estudo do perfil eletroforético do sistema nervoso central foi retirado o gânglio subesofágico (Figura 5) com auxílio de pinças específicas.

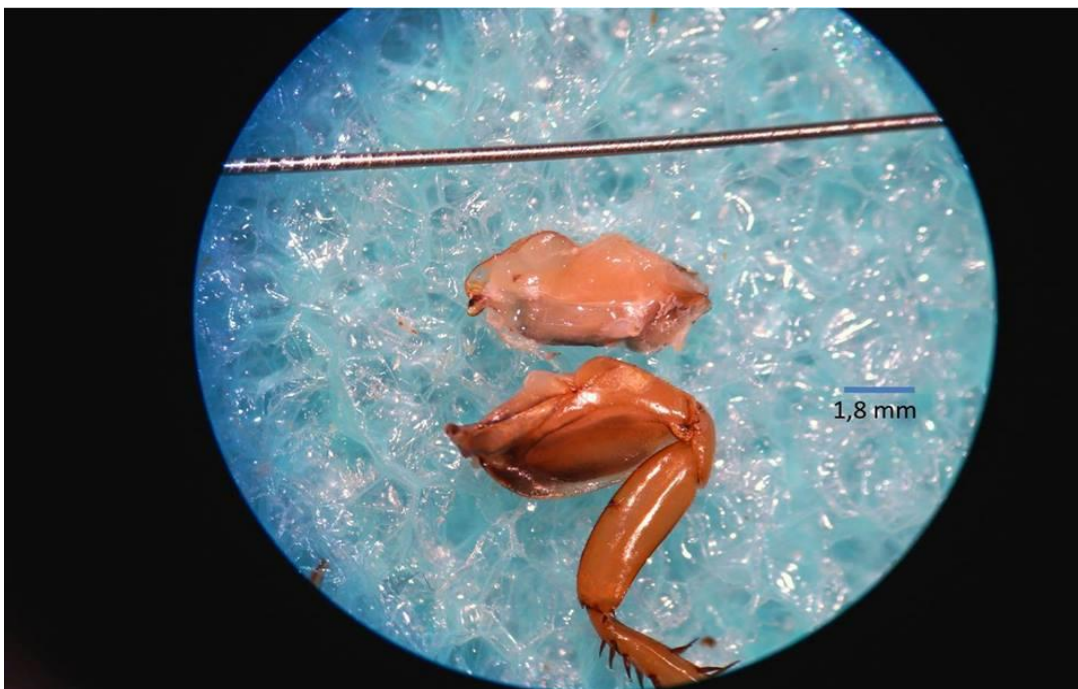
Figura 5 – Gânglio subesofágico



Fonte: Autor

A estrutura extraída para o perfil das proteínas do sistema nervoso periférico foi a junção neuromuscular da coxa (Figura 6), localizada no terço proximal das patas posteriores da barata.

Figura 6 – Junção neuromuscular



Fonte: Autor

3.2 Homogeneização e Solubilização das Estruturas

Foram extraídos um total de 20 gânglios e 20 patas para cada experimento. Em um primeiro momento, as amostras foram homogeneizadas mecanicamente (Homogeneizador Marconi mod. MA 099) com 300 μ l de solução contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), 2 mM EDTA, 1 mM DTT e 1 mM AEBSF. A homogeneização foi finalizada com o auxílio de uma seringa de insulina. Após, foram adicionados os detergentes Triton X-100 (SIGMA, X-100-PC) ou SDS (BIO RAD, 161-0302) na concentração final de 0,5 % em cada conjunto de 10 estruturas, ou seja, 10 gânglios em solução com SDS 0,5 %; os outros 10 gânglios em solução com TX-100 0,5 %. Da mesma maneira foi feito com as patas, obtendo um total de 4 conjuntos de 600 μ L: gânglio subesofágico com SDS 0,5 % ou TX-100 0,5 % e junção neuromuscular com SDS 0,5 % ou TX-100 0,5 %. Foram retirados 100 μ L de cada conjunto para fazer a dosagem de proteínas do homogenato total e para os 500 μ L de cada conjunto foi realizada centrifugação a 14.000 rpm por 5 min a 8°- 4°C. O sobrenadante foi retirado, congelado a -20°C e, posteriormente, foi realizada a dosagem de proteínas do sobrenadante.

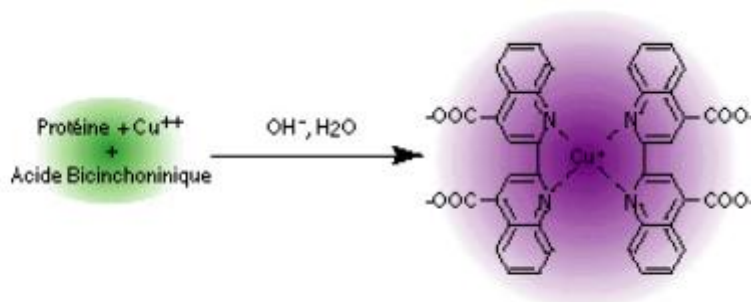
3.3 Dosagem de proteínas

Para a dosagem das proteínas (Figura 8) foi utilizado o método do ácido bicinconínico (Pierce BCA Protein Assay kit, Hill & Straka, 1988). O método baseia-se na capacidade das proteínas, em meio alcalino, reduzirem o cobre (Figura 7) de Cu^{2+} a Cu^{1+} (Wiechelman et al 1988). O cobre juntamente com o BCA formam um complexo de cor púrpura. Posteriormente, foi feita a leitura da absorbância em comprimento de onda de 562 nm ($\lambda = 562$ nm).

A dosagem protéica através do BCA consiste no uso da fotolorimetria, a qual possui a finalidade de dosar substâncias biológicas que absorvem luz a um dado comprimento de onda, provenientes de reações que resultam em soluções coloridas. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração da substância que está sendo dosada. Em consequência desta proporcionalidade, é possível dosar substâncias em soluções de concentração

desconhecida (amostra), ao comparar a intensidade da cor produzida por esta substância à intensidade da cor produzida pela mesma substância em outra solução onde a concentração é previamente determinada (padrão).

Figura 7 – Princípio do método de quantificação de proteínas micro BCA.



Fonte: <http://molar.crb.ucp.pt/cursos/1>

Figura 8 – Protocolo utilizado para a elaboração da curva padrão de proteínas, preparado em placa de 96 poços. A diluição é feita retirando 25 μL do poço correspondente*.

TUBO	BSA	DILUENTE/ H ₂ O	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	VOL. FINAL
Branco	0	50 μl	0	50 μl
A	50 μl	0	2	25 μl
B	25 μl *A*	25 μl	1	25 μl
C	25 μl *B*	25 μl	0,5	25 μl
D	25 μl *C*	25 μl	0,25	25 μl
E	25 μl *D*	25 μl	0,125	25 μl
F	25 μl *E*	25 μl	0,0625	50 μl

Fonte: Autor

3.4 Eletroforese

A eletroforese unidimensional é uma técnica para separar misturas de proteínas envolvendo a migração de partículas a partir da aplicação de uma diferença de potencial em um gel de poliácridamida ou agarose. As moléculas são separadas conforme sua massa molecular. Ao aplicar a corrente elétrica

todas as proteínas possuem a mesma carga, graças ao SDS presente na solução de solubilização das amostras, e migram em direção ao eletrodo positivo, sendo assim separadas pela diferença entre a massa molecular. As proteínas menores migram mais rapidamente, enquanto as maiores têm mais dificuldade de atravessar a malha do gel e, portanto, movem-se mais lentamente. Essa técnica foi descrita por Laemmli (1970), sendo relativamente simples e de baixo custo, a sua grande vantagem é a possibilidade de visualizar um número maior de proteínas.

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes foi realizada em um gel de separação homogêneo de 7,5% (30% acrilamida/bisacrilamida - 37,5 : 1). A migração do gel (ou corrida) ocorreu em 100 V até as proteínas atingirem o gel de separação, após a chegada neste gel a voltagem foi aumentada para 150 V.

Para visualização das proteínas após a corrida eletroforética foi realizada a revelação das frações proteicas ou bandas com o corante coomassie Blue G 250 (SIGMA, B- 0630).

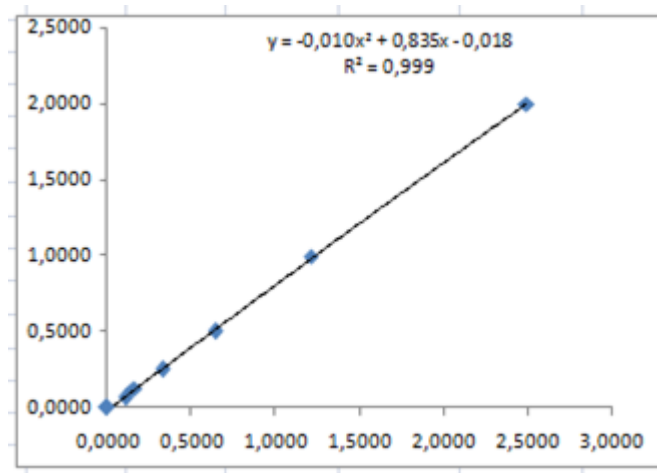
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dosagem de proteínas

Após as diluições, feitas de acordo com o protocolo, foi realizada a estimativa da dosagem de proteínas encontrada em cada conjunto: gânglio SDS; gânglio TX-100; pata SDS; pata TX-100, de acordo com método de quantificação estabelecida em tabela Excel pré-programada (Dept. Bioquímica - UFRGS).

A construção da curva (Figura 9) foi feita em duplicata e o valor da média é utilizado respectivamente na concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) encontrada.

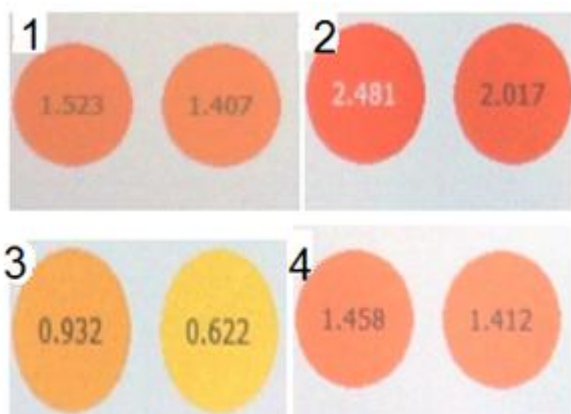
Figura 9 – Representação de uma curva para dosagem de proteínas.



Fonte: Autor

Após a construção da curva, os valores da absorbância (Figura 10) obtidos foram utilizados na fórmula com o fator de calibração já calculado para estimar o valor de proteína presente na solução na concentração µg/ µL.

Figura 10 – Valores de absorbância obtidos na dosagem de proteínas: duplicatas de junção neuromuscular (JN) de homogenato, sobrenadante com os respectivos tratamentos: 1- Homogenato SDS; 2- Homogenato TX-100; 3- Sobrenadante SDS; 4- Sobrenadante TX-100.



Fonte: Autor

O próximo passo foi realizar o cálculo da quantidade de amostra (Figura 11) a ser utilizada na eletroforese (10-30 µg/poço). A amostra foi então diluída em tampão de amostra 2x concentrado com a seguinte constituição: 0,125 MTRIS-Hcl (pH 6,8); 4 % SDS; 20 % glicerol; 10 % DTT e azul de bromofenol.

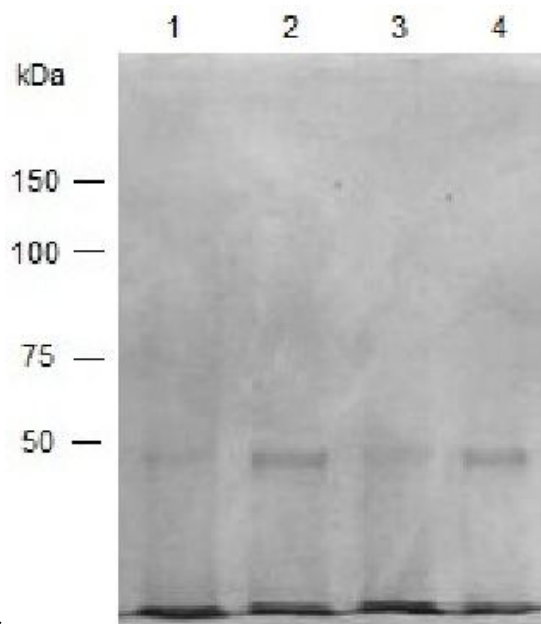
Figura 11 – Concentração de proteína das amostras de homogenato (h) e sobrenadante (s) em junção neuromuscular com os tratamentos indicados. Os valores em roxo são duplicatas da absorbância, em verde a média destas e em amarelo o valor obtido através da fórmula da curva, correspondendo a quantidade de proteína de cada conjunto, ou seja, a concentração de proteínas em µg.µL.

	hSDS	hTX-100	sSDS	sTX-100
	1,523	2,481	0,622	1,458
	1,407	2,017	0,932	1,412
Média	1,4650	2,2490	0,7770	1,4350
	2,664679	4,707044695	1,17105	2,59373

Fonte: Autor

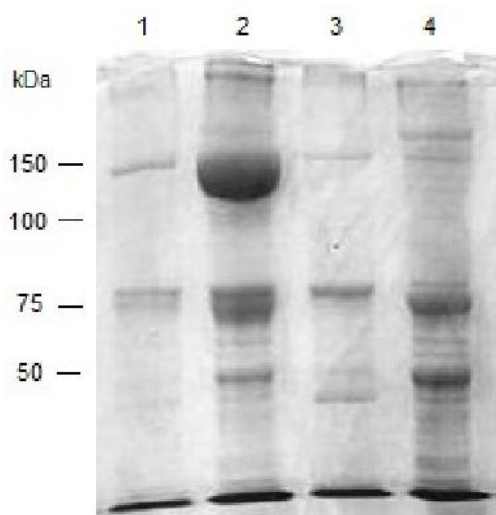
Os géis das duas estruturas estudadas, gânglio subesofágico (Figura 12) e junção neuromuscular (Figura 13), mostraram um maior número de proteínas (ou bandas) nas amostras com TX-100 em relação as amostras com SDS. Isto sugere que o TX-100 na concentração utilizada (0,5 %), é mais eficiente na solubilização das proteínas de gânglio e coxas de baratas do que o SDS na concentração de 0,5 %. Quanto ao gânglio, apenas uma banda proteica ficou marcada na faixa de 50 kDa, o que indica que o gânglio subesofágico não é a melhor estrutura para analisar o perfil eletroforético de SNC ou, ainda, que outras concentrações destes detergentes devem ser testadas. Em relação a JN, o número de bandas no gel foi mais expressivo. Em ambas estruturas, nas amostras de homogenato total as bandas ficaram menos nitidas em relação as amostras de sobrenadante, onde observa-se uma maior pureza devido a centrifugação e a remoção do pellet.

Figura 12 – Perfil eletroforético de gânglio subesofágico solubilizado com 0,5 % dos detergentes TX-100 ou SDS: 1- Homogenato SDS, 2- Homogenato TX-100, 3- Sobrenadante SDS, 4- Sobrenadante TX100.



Fonte: Autor

Figura 13– Perfil eletroforético de junção neuromuscular solubilizado com 0,5 % dos detergentes TX-100 ou SDS: 1- Homogenato SDS, 2- Homogenato TX-100, 3- Sobrenadante SDS, 4- Sobrenadante TX100.



Fonte: Autor

Mais experimentos usando outras concentrações de SDS são necessários. Com relação ao TX-100 tivemos um resultado melhor com essa concentração (0,5%), mas ainda assim é necessário testar outras concentrações para aprimorar o perfil eletroforético.

Quanto ao fraco perfil eletroforético obtido com o gânglio subesofágico, além de testar outras concentrações de detergentes, possivelmente outras estruturas de SNC devam ser dissecadas em conjunto ao gânglio para obter-se um perfil eletroforético de SNC mais confiável. O ideal seria dissecar o cérebro completo junto ao gânglio subesofágico, porém o difícil acesso e a fragilidade destas estruturas tornaram inviável esta etapa até o momento. Novos métodos de dissecação poderão nos auxiliar nesta tarefa.

Sem dúvida o uso de anticorpos específicos de proteínas de receptores de neurotransmissores será fundamental para aprimorar o perfil eletroforético das estruturas estudadas.

Com relação à junção neuromuscular muitas proteínas foram marcadas na faixa de 50 a 150 kDa. Assim, sabendo da atuação do glutamato na JN podemos sugerir a existência de receptores glutamatérgicos tanto do tipo AMPA como NMDA, através de banco de dados que nos possibilitem, através do gene específico, saber a sequência de aminoácidos e assim a sua massa molecular. Porém, devido as modificações pós-transducionais a banda marcada não possuirá a massa molecular predita. Por isso estamos inferindo que dentre os valores de 50kda a 150kda podem existir tais receptores. A comparação foi feita com as espécies *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens* (Tabela 2):

Tabela 2: Valores de massa molecular de receptores glutamatérgicos de *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens* com endereço do banco de dados.

Espécie	Nome do receptor	Massa (kDa)	Banco de dados
<i>Drosophila m.</i>	AMPA IA	111.7	http://flybase.org/reports/FBgn0004619
<i>Drosophila m.</i>	NMDA 1	112.3	http://flybase.org/reports/FBgn0010399
<i>Homo sapiens</i>	AMPA 3	101.1	http://www.uniprot.org/uniprot/P42263
<i>Homo sapiens</i>	NMDA 1	105.3	http://www.uniprot.org/uniprot/Q05586

Fonte: Autor

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS e PERSPECTIVAS

De acordo com os nossos resultados o perfil eletroforetico de sistema nervoso central requer mais experimentos. Provavelmente, será necessário um método aprimorado de dissecação que englobe o cérebro e o cordão nervoso ventral, além do gânglio subesofágico. Também deverão ser testadas novas concentrações dos detergentes SDS e TX-100, tanto para SNC como para SNP. Ainda, além de anticorpos específicos, o uso de reagentes que detectem fosforilação será importante na complementação do perfil eletroforetico de sistema nervoso central e periférico de baratas *Phoetalia pallida*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH E. A. M.; Eldefrawi M. E.; Eldefrawi A. T. **Pharmacologic characterization of muscarinic receptors of insect brains**. Arch. Insect Biochem. 17: 107-118,1991.

ALBERTO J. L.; Lingle C. J. **Activation of nicotinic acetylcholine receptors on cultured *Drosophila* and other insect neurones**. J. Physiol.(Lond.) 463: 605-630, 1993.

ARNOLD T.; Linke D. **Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins**. Biotechniques.;43:427-30, 432, 434 passim 2007.

ATTWELL D.R.;Mobbs P. **Neurotransmitter transporters**. Current Opinion in Neurobiology 4:353-359, 1994.

BLOOM F.E.;Iversen L.L. **Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography**. Nature, 229(5287), 628-630, 1971.

BOURNE H.R.**How receptors talk to trimeric G proteins**. Current Opinion in Cell Biology 9, 134-142,1997.

CAPOGNA M.;Gahwiler B.H.; Thompson S.M. **Calcium-independent actions of α -latrotoxin on spontaneous and evoked synaptic transmission in the hippocampus**. J Neurophysiol.;76:3149–3158, 1996.

COLQUHOUN D.; Sakmann B. **From muscle endplate to brain synapses: a short history of synapses and agonist-activated ion channels**.Neuron 20, 381–387, 1998.

DINGLELINE R.; Borges K.; Bowie D.; Traynelis S.F. **The glutamate receptor ion channels**. Pharmacological Reviews v. 51: p. 7-61, 1999.

GALLO, D.; Nakano O.; Silveira N. S.; Carvalho R. P. L.; Batista G. C.; Berti F. E.; Parra J. R. P.; Zucchi R. A.; Alves S. B.; Vendramin J. D.; Marchini L. C.; Lopes J. R. S.; Omoto C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, . p 920, 2002.

Hill H.D.; Straka J.G. **Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents.** Anal Biochem. Apr;170(1):203–208,1988.

HOFFMAN B. B.; Lefkowitz R.J.; Taylor P. **Neurotransmission: Drugs acting at synaptic and neuroeffector junctional sites.** New York: McGraw-Hill, 9a edição,p. 105-139,1996.

IVERSEN L.L.; Bloom F.E. **Studies of the uptake of 3 H-gaba and (3 H)glycine in slices and homogenates of rat brain and spinal cord by electron microscopic autoradiography.** Brain Res. Jun8;41(1):131–143,1972.

KANDEL E.R.; Schwartz J.H.; Jessell T.M (Eds.).**Principles of neural sciences.** NewYork: McGraw-Hill, p. 19-45, 2000.

KELLY R. **Storage and release of neurotransmitters.** Cell 72:43-53,1993.

LAEMMLI U.K.**Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.**Nature 227:680-685,1970.

MONAGHAN D.T.; Bridges R.J.; Cotman C.W. **The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system.** AnnuVerPharmacolToxicol 29, 365–402,1989.

NICOLL R. A.; Malenka R. C.; Kauer J. A. **Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system.** Physiological Reviews 70, 513-565, 1990.

ROSENMUND C.; Stem-Bach Y.; Stevens CF. **The tetrameric structure of a glutamate receptor channel.** Science 280:1596-1599,1998

SHINOZAK I. **Pharmacology of the glutamate receptor.** Prog.Neurobiol. 30, 399-435,1988.

SMITH P.K.; Krohn R.I.; Hermanson G.T.; Mallia A.K.; Gartner F.H.; Provenzano M.D.; Fujimoto E.K.;Goetze, N.M.; Olson B.J.; Klenk D.C. **Measurement of protein using bicinchoninic acid.**Anal.Biochem.150, 76-85, 1985.

WIECHELMAN K.; Braun R.; Fitzpatrick, J. **Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for colorformation.** Anal Biochem.175, 231-237, 1988.

<http://www.labome.com.br/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>