JEAN CÉSAR FARIAS DE QUEIROZ

**Análise genotípica da linhagem RT2 de *Aspergillus
nidulans* e caracterização de sua glicoproteína
antiinflamatória**

Tese (Doutorado) apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para
obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

São Paulo
2007

JEAN CÉSAR FARIAS DE QUEIROZ

Análise genotípica da linhagem RT2 de *Aspergillus nidulans* e caracterização de sua glicoproteína antiinflamatória

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Tânia M. A. D. Zucchi

São Paulo
2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Queiroz, Jean César Farias.

Análise genotípica da linhagem RT2 de *Aspergillus nidulans* e caracterização de sua glicoproteína antiinflamatória / Jean César Farias Queiroz. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Tânia Maria Araújo Domingues Zucchi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia EP/IPT/ICB/Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Bioquímica microbiana / Farmacologia experimental.

Versão do título para o inglês: Genotypic analysis of *Aspergillus nidulans* RT2 strain and characterization of its antiinflammatory glycoprotein.

Descritores: 1. *Aspergillus nidulans* 2. Glicoproteína 3. Nandina 4. Antiinflamatório 5. COX-2 I. Zucchi, Tânia Maria Araújo Domingues II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB184/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Jean César Farias Queiroz.

Título da Tese: Análise genotípica da linhagem RT2 de *Aspergillus nidulans* e caracterização de sua glicoproteína antiinflamatória .

Orientador(a): Tânia Maria Araújo Domingues Zucchi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN**

Av. Vital Brasil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 – Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 426/07, sobre o projeto intitulado “Análise genotípica da linhagem RT2 de *Aspergillus nidulans* e caracterização de sua glicoproteína antiinflamatória”, sob a responsabilidade de Jean César Farias de Queiroz está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **14/11/2007**.

São Paulo, 14 de novembro de 2007.

Dr. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

DEDICATÓRIA

A minha esposa

Lúcia Fernanda

Por todo apoio, desde nossa vinda a São Paulo, durante o mestrado e agora no doutorado, quando tivemos nossa filha e passamos por desafios e conquistas juntos.

Todo reconhecimento está também evidenciado no nome do objeto de estudo desta tese a “Nandina”, em homenagem a Fernanda.

A nossa filha

Íris Hana

Fruto do nosso amor, que é o meu grande feito até hoje e minha inspiração.

Aos meus familiares

Minha Mãe

Maria Helena

Um exemplo de como a educação pode mudar a vida
de uma pessoa.

Meus irmãos

Joel, Jovane e Juliano

Meus companheiros de infância e por toda a vida.
Tenho muito orgulho de tê-los como irmãos.

AGRADECIMENTOS

A Dr^a **Tânia Zucchi**, pela orientação e apoio, desde a graduação, no lado científico e no lado pessoal.

Aos colegas do Laboratório de Genética de Fungos: Dr. **Gutemberg**, Dr. **Thiago** e Dr^a **Nanci**.

Ao **Instituto Butantan**, em especial ao laboratório de farmacologia, pelo acolhimento em seus laboratórios.

Dedico agradecimento especial a Dr^a **Catarina Teixeira**, pela sua co-orientação em toda pós-graduação, a todo aprendizado sobre inflamação e ao acolhimento pessoal a mim dedicado.

Agradeço especialmente a Dr^a **Vanessa Moreira** pela enorme ajuda nos experimentos, nas discussões e na confecção desta tese.

Aos pesquisadores Dr. **Ivo Lebrun** (Bioquímica), Dr^a **Maísa Delacasa** (Imunopatologia), Dr^a **Fernanda Portaro** (Imunogenética),

Aos colegas do Instituto Butantan: **Renata**, **Sílvia**, **Cristina**, **Polyana**, **Marlos**, **Neide**, **Sérgio**, **Márcio**, **Élbio**, **Sandra** e **Milena**.

Ao **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN** – pelo acolhimento em seus laboratórios.

Dedico agradecimento especial ao Dr. **Patrick Spencer**, por sua co-orientação nesta tese e todo aprendizado extra, científico e pessoal, que adquiri com ele.

Aos pesquisadores do IPEN: Dr^a **Nanci Nascimento** e Dr^a **Lígia**.

Aos funcionários do IPEN: Dr. **Johnny, Eduardo e Rute**.

Aos colegas do IPEN: **Marcos Júnior, Alberto, Murilo, Diego, Erika, Mosca, Karina, Janaína, Priscila, Thiago, Vanessa, Larissa, Rosa, Daniele, Natália, Kely, Suzana, Beatriz, Renata, Claudinha e Taís**.

Aos pesquisadores da University Texan in El Paso (UTEP) Dr. **Igor Almeida** e Dr. **Ernesto Nakayasu**, pelas análises em espectrometria de massa.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da Interunidades em Biotecnologia: **Eliane, Fábria e Marcos**.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – **CNPq** – pela concessão da Bolsa de doutorado e Taxa de Bancada.

Obrigado!

Resumo

Queiroz JCF. Análise genotípica da linhagem RT2 de *Aspergillus nidulans* e caracterização de sua glicoproteína antiinflamatória [Tese de Doutorado]. São Paulo: Interunidades em Biotecnologia. Universidade de São Paulo; 2007.

A transformação da linhagem UT448 de *Aspergillus nidulans*, com RNA de macrófagos de ratos estimulados com lipopolissacarídeos (LPS), resultou na linhagem RT2, produtora de uma glicoproteína antiinflamatória denominada Nandina. Nosso objetivo foi avaliar geneticamente os eventos ocorridos por esta transformação e identificar e caracterizar esta glicoproteína quanto à natureza bioquímica e sua atividade. Para tal, foi realizada a análise de polimorfismo amplificado ao acaso (RAPD) e análise fenotípica destas linhagens. A Nandina foi purificada via exclusão molecular seguida de fase reversa e analisada por espectrometria de massa. Testes da atividade antiinflamatória *in vivo* foram realizados em peritonite e edema de pata em camundongos induzida por carragenina e inibição dos receptores de glicocorticóides. Os testes *in vitro*, sobre a produção das ciclooxygenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e de prostaglandina E₂ (PGE₂), foram realizados em cultura primária de macrófagos, estimulados com LPS. Os resultados provenientes do RAPD mostraram a linhagem RT2 é resultante da linhagem parental UT448, mas contém diferenças polimórficas em seu genoma. A Nandina purificada possui ~40KDa. A espectrometria de massa caracterizou dois fragmentos da proteína e revelou que sua glicosilação é composta por N-acetilglicosamina ligada a hexoses. Os testes *in vivo* mostraram que a Nandina possui atividade antiinflamatória, inibindo o edema de pata e o influxo leucocitário de polimorfonucleares (6h) e mononucleares (96h) para o peritônio. Os experimentos com RU38486 evidenciaram que esta atividade não ocorre via eixo hipófise-hipotálamo-adrenal, ou seja, não atua via liberação de glicocorticóides endógenos, mas sim da inibição da produção de COX-2, mas não de COX-1 e nem de seu produto PGE₂, como demonstrado *in vitro* na cultura de macrófagos.

Palavras-chave: *Aspergillus nidulans*, glicoproteína, Nandina, antiinflamatório, COX-2.

Abstract

Queiroz JCF. Genotypic analysis of *Aspergillus nidulans* RT2 strain and characterization of its antiinflammatory glycoprotein [Doctoral Thesis]. São Paulo: Interunidades em Biotecnologia. Universidade de São Paulo; 2007.

Aspergillus nidulans UT448 strain genetic transformation with total RNA obtained from lipopolisaccharide (LPS)-stimulated macrophages resulted on a RT2 strain, of which main outcome was the production of a glycoprotein with anti-inflammatory properties. Main objectives were to evaluate the genetics events induced by the introduced exogenous RNA, to define the produced glycoprotein on biochemical grounds, and to characterize its activity. For such, randomic amplified polymorphic DNA (RAPD) and phenotypical analysis, were performed. The Nandin was molecular exclusion and reverse phase purified. For sequencing and carbohydrates analysis the Nandin was mass spectrometry analyzed. *In vivo* antiinflammatory activity tests were performed under carrageenan induced peritonitis, paw edema, and glucocorticoid receptors inhibition. The *in vitro* tests, over production and activity of ciclooxygenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) and prostaglandin E₂ (PGE₂), were performed in LPS-stimulated macrophage primary culture. The results show that the used RT2 strain, despite originated from the UT448 strain, present on its genome, polymorphic differences. The purified glycoprotein is ~40KDa. After mass spectrometry two protein fragments were sequenced and these reveal that glycosylation is composed by N-acetylglucosamin bound to hexoses. The *in vivo* tests showed that the glycoprotein has antiinflammatory activity inhibiting paw edema and polimorphonuclears (6h) and mononuclears (96h) peritoneal leukocyte influx. The RU38486 experiments evidenced that activity is not through hypophysis-hypotamus-adrenal axis, what means that its action do not involve endogenous glucocorticoid release, but inhibition of COX-2 expression. However concerning the latter mechanism, it could be demonstrated that neither COX-1, nor its product PGE₂ are involved, as shown by *in vitro* experiments using macrophages cultures

Key words: *Aspergillus nidulans*, glycoprotein, Nandin, antiinflammatory, COX-2.

Lista de Figuras

	Página
Figura 3.1: Estrutura química do composto RU 38486.	43
Figura 1: Fotografias digitais das linhagens UT448 e RT2.	47
Figura 2: Perfis de amplificação por RAPD para os iniciadores OPQ20 e OPC20.	49
Figura 3: Perfis de amplificação por RAPD para os iniciadores OPG10 e OPM20.	49
Figura 4: Perfis de amplificação por RAPD para os iniciadores OPJ20, OPV10 e OPK10.	50
Figura 5 – Dendrograma gerado a partir dos perfis de RAPD para análise interespecífica e intraespecífica a partir dos Coeficientes de Jaccard (A) e Simple Matching (B).	51
Figura 6 – Dendrograma gerado a partir dos perfis de RAPD. Coeficiente de similaridade estimado a partir do Coeficiente de Jaccard.	52
Figura 7 – Dendrograma gerado a partir dos perfis de RAPD. Coeficiente de similaridade estimado a partir do Coeficiente Simple Mathcing.	53
Figura 8: Cromatograma da purificação realizada em sistema FPLC acoplada coluna Superdex 75.	54
Figura 9: Cromatografia de exclusão molecular em sistema HPLC utilizando coluna TSK3000SW.	54
Figura 10: Re-cromatografia de exclusão molecular em sistema HPLC utilizando coluna TSK3000SW.	55
Figura 11: Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna C18.	56
Figura 12: SDS-PAGE a 12%, sob condições redutoras, da proteína purificada do sobrenadante da cultura da linhagem RT2 de <i>Aspergillus nidulans</i> , seguido de coloração por nitrato de prata.	57
Figura 13: Sequenciamento <i>De Novo</i> do peptídeo produzido (TLSPDLDCSR) por tripsinização da proteína purificada.	58
Figura 14: Sequenciamento <i>De Novo</i> do peptídeo produzido (VVTVLSPR) por tripsinização da proteína purificada.	58
Figura 15: Alinhamento dos peptídeos seqüenciados contra o banco de dados do genoma do <i>A. nidulans</i> FGSC A4, via BLAST/NCBI.	59
Figura 16: Seqüência genômica do cromossomo I do <i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4, contig 1.115 e demarcações da regiões de interesse.	60-61
Figura 17: Análise da composição de carboidratos na proteína purificada via espectrometria de massa em sistema MS-MS-TOF.	62
Figura 18: Inibição do eixo hipófise-hipotálamo via RU38486 na inibição por	63

Nandina do edema de pata em camundongos.

Figura 19: Cinética da inibição por Nandina do acúmulo de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos induzido por carragenina. **65**

Figura 20: Viabilidade celular determinada por LDH **66**

Figura 21: Viabilidade celular determinada por MTT **67**

Figura 22: Normalização da densitometria das bandas de *Western blot* para COX-2 **68**

Figura 22: Normalização da densitometria das bandas de *Western blot* para COX-1 **70**

Figura 24: Quantificação de PGE₂ no sobrenadante da cultura de macrófagos **71**

Lista das principais abreviaturas

a priori - aquilo que precede a experiência.

ad libitum – à vontade.

ADA – adenosina deaminase.

ANOVA – análise de variância.

bp – pares de bases.

cDNA – DNA complementar ao RNA mensageiro.

CIA – clorofórmio-álcool isoamílico.

COX-1 – enzima ciclooxigenase 1.

COX-2 – enzima ciclooxigenase 2

Da – Daltons – unidade de peso molecular protéico.

Dane – Degenerated *Aspergillus nidulans* elements.

DO – densidade ótica.

DSBs – quebras no DNA fita dupla.

EIA – ensaio imunoenzimático específico.

ELISA – ensaio imunoadsorvente ligado a enzima.

EMS – etano metil sulfonato.

EST – Expressed Sequence Tags.

Exon – sequência gênica participante da codificação do RNAm.

FPLC – cromatografia líquida de rápida performance.

FTMS – Fourier transform mass spectrometry.

g – gravidade produzida pela centrifugação.

HPLC – cromatografia líquida de alta precisão.

in vivo – utilizando organismos vivos.

in vitro – utilizando células em cultura.

Kb – kilo bases – 1 mil pares de bases.

KDa – mil Daltons.

KV – 1000 volts.

LDH – enzima lactato desidrogenase.

LINEs – elementos nucleares longamente interestersados.

LPS – lipopolissacarídeos da parede celular de *E. coli*.

LTR – repetição terminal longa.

MATE – móbile Aspergillus transformation enhancer.

Mb – mega bases – 1 milhão de pares de bases.

MC – meio completo.

mg – grama x 10^{-3} .

mL – litro x 10^{-3} .

MM – meio mínimo.

MN – células mononucleares.

MPO – mieloperoxidase.

MTT – brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2il 2,5-difenil tetrazol

MVSP – Multi-variate Statistical Package.

ng – grama x 10^{-9} .

NHEJ – Junção final não homóloga do DNA – recombinação não homóloga.

NO – óxido nítrico.

p – significância probabilística.

PBS – *Phosphate buffered saline* – solução salina tamponada com fosfato.

PCR – reação de polimerase em cadeia.

pg – grama x 10^{-12}

PGE₂ – prostaglandina E₂.

PMN - células polimorfonucleares.

q.s.p. – quantidade suficiente para.

Q-ToF – espectrômetro de massa quadrupolo com análise por tempo de voo.

r.p.m. – rotações por minuto.

RAPD – polimorfismo DNA amplificado ao acaso.

RNAi – RNA de interferência

rRNA – RNA ribossômico.

RU38486 – droga antagonista do receptor de glicocorticoide.

ASB – Albumina Sérica Bovina.

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio.

SG – similaridades genéticas.

SINEs – elementos nucleares curtamente interesparsados.

SM – meio seletivo.

TBM – Tetrametilbenzidina.

TCA – ácido tricloroacético.

tRNA – RNA transportador.

UPGMA – unweighted pair group analysis, using arithmetic means.

UTR – região não transcrita

V – volt, unidade de tensão elétrica.

µg – grama x 10⁻⁶.

Sumário

	Página
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Considerações gerais sobre <i>Aspergillus nidulans</i>	19
1.2 <i>Aspergillus nidulans</i> – considerações gerais dos ciclos de vida	21
1.3 Mecanismos de reparo e recombinação	23
1.4 Tratamento do <i>A. nidulans</i> com RNA	26
1.5 Glicoproteínas de <i>Aspergillus</i>	27
1.6 Considerações gerais sobre inflamação	28
2 OBJETIVOS	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i>	34
3.2 Cultivo das linhagens	34
3.3 Detecção de polimorfismos gênicos nas linhagens UT448 e RT2 de <i>Aspergillus nidulans</i> por meio de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)	35
3.3.1 Cultivo dos isolados para extração do DNA genômico	35
3.3.2 Extração de DNA	36
3.3.3 Seleção de iniciadores aleatórios	36
3.3.4 Condições da Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)	37
3.3.5 Análise dos dados genômicos	37
3.4 Cultivo das linhagens para produção de proteínas	38
3.5 Purificação protéica do sobrenadante das linhagens de <i>A. nidulans</i>	38
3.5.1 Gel-Filtração	39
3.5.2 Cromatografia de exclusão molecular em sistema HPLC	39
3.5.3 Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC	39
3.6 SDS-PAGE	40
3.7 Sequenciamento <i>De Novo</i> em espectrometria de massa	40
3.8 Ensaio <i>in vivo</i> do efeito antiinflamatório	41
3.8.1 Animais	41
3.8.2 Edema de pata induzido por Carragenina	41
3.8.3 Estudo do efeito da Nandina sobre o influxo leucocitário peritoneal	42
3.8.4 Tratamento farmacológico para a inibição da ação de glicocorticóides endógenos	43
3.9 Ensaios do efeito antiinflamatório da Nandina em modelos experimentais <i>in vitro</i>	43

3.9.1 Coleta de macrófagos peritoneais e protocolo experimental para os ensaios <i>in vitro</i>	43
3.9.2 Determinação do efeito citotóxico	44
3.9.2.1 Análise da liberação da lactato desidrogenase (LDH)	44
3.9.2.2 Ensaio da redução do brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2il 2,5-difenil tetrazol (MTT)	44
3.9.3 Análise por Western blot	45
3.9.4 Quantificação de PGE2 por ensaio imunoenzimático específico (EIA)	46
3.10 Análises estatísticas	46
4 RESULTADOS	47
4.1 Comparação entre as linhagens UT448 e RT2 de <i>Aspergillus nidulans</i>	47
4.1.1 Análise fenotípica	47
4.1.2 Análise genotípica das linhagens estudadas via DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA)	48
4.1.3 Análise de Agrupamento	51
4.2 Purificação da proteína antiinflamatória	53
4.3 Sequenciamento da proteína purificada via espectrometria de massa	57
4.4 Reconhecimento do gene referente à proteína de estudo no genoma do <i>Aspergillus nidulans</i> via bioinformática	58
4.5 Análise, via espectrometria de massa, da composição de carboidratos na proteína purificada	62
4.6 Efeito antiinflamatório da Nandina <i>in vivo</i>	63
4.6.1 Inibição da resposta edematogênica	63
4.6.2 Inibição do influxo leucocitário para o peritônio	64
4.7 Efeitos da Nandina <i>in vitro</i>	66
4.7.1 Citotoxicidade da Nandina em cultura de macrófago	66
4.7.1.1 Teste de LDH	66
4.7.1.2 Teste de MTT	67
4.7.2 Ação da Nandina sobre a produção das ciclooxygenases 1 e 2 de macrófagos residentes induzida por LPS	67
4.7.3 Quantificação de prostaglandina E₂ no sobrenadante da cultura de macrófagos	70
4 DISCUSSÃO	72
5 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre o gênero *Aspergillus*

Os fungos são microrganismos eucarióticos que interagem com o ambiente a sua volta (Bahn *et al.*, 2007). Eles produzem esporos com a função principal de propagação, sobrevivência e infecção. Seus esporos são encontrados em todos os locais habitados pela humanidade e tem impacto significativo na vida cotidiana (Hardin *et al.*, 2003; Crameri *et al.*, 2006).

O gênero *Aspergillus*, por exemplo, inclui espécies que têm importância na indústria farmacêutica, como a produção de antibióticos (Andrade *et al.*, 2000), de alimentos (MacCabe *et al.*, 2002), apesar de serem agentes causadores de doenças em plantas, animais e no homem, assim como a produção de micotoxinas, principalmente a aflatoxina (Dezotti e Zucchi, 2001).

Os fungos *Aspergillus* são patógenos oportunistas causadores, principalmente, de infecções pulmonares invasivas, propensas a disseminação para outros órgãos e representam o estado o mais comum e o mais letal da doença nos seres humanos. Ainda estes fungos são agentes causadores de sinusite fúngica, asma e alveolite alérgica em pacientes imunocomprometidos (Shah *et al.*, 2001).

Aspergillus é um gênero de fungos filamentosos saprofíticos encontrados em muitos ambientes. Eles esporulam abundantemente, espalhando grandes quantidades de conídios na atmosfera. O pequeno diâmetro destes conídios (2 a 5 µm) favorece o alcance destes fungos até o alvéolo pulmonar (Latge, 1999). As defesas pulmonares do hospedeiro contra *Aspergillus* são mediadas por células fagocitárias do sistema imune inato.

A aspergilose invasiva acarreta em uma resposta inflamatória específica quando *Aspergillus* sp. é o agente injuriante (Shibuya *et al.*, 2004). No local da infecção, macrófagos alveolares e leucócitos polimorfonucleares (PMN) controlam e eliminam o fungo presentes nas vias aéreas superiores (Nagai *et al.*, 1995; Mehrad *et al.*, 1999a,b; Brieland *et al.*, 2001). Os macrófagos eliminam os conídios por fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a proteção contra as formas hifais é mediada pelos PMNs por meio da produção de peróxido de hidrogênio (Schaffner *et al.*, 1982; Rex *et al.*, 1990).

A espécie de maior importância clínica é o *Aspergillus fumigatus*, causadora de mais de 90% das infecções pulmonares invasivas em humanos (Latge, 1999; Brookman e Denning, 2000). No entanto, outras espécies de *Aspergillus*, como o modelo genético *Aspergillus nidulans*, podem infectar pacientes imunocomprometidos e agravar doenças pré-existentes (Segal *et al.*, 1998; Marr *et al.*, 2002). A relevância clínica do *A. fumigatus* e do *A. nidulans* como um modelo de sistema fúngico justificou o recente sequenciamento genômico em ambas as espécies (Galagan *et al.*, 2005).

Todas as espécies reproduzem assexuadamente, pela formação de cadeias de esporos assexuais (conídios) brotando de uma estrutura especializada, denominada conidióforo. Entre eles, *Aspergillus (Emericella) nidulans* constitui um modelo excelente para estudo do mecanismo do desenvolvimento assexual (conidiação) (Timberlake e Clutterbuck, 1994; Adams *et al.*, 1998).

O microrganismo eucarioto multicelular *Aspergillus nidulans* é um modelo usado para o estudo de processos biológicos, com aplicabilidade no âmbito biotecnológico e industrial, além de contribuir para o melhor entendimento de patogenicidades fúngicas. *A. nidulans* é facilmente manipulado no uso de genética clássica e molecular.

Um dos primeiros trabalhos sobre a genética da expressão da tubulina e dos microtúbulos foi feito em *A. nidulans* (Clutterbuck, 1970). Similarmente, o *A. nidulans* contribuiu para o entendimento da mitose e da função intracelular do motor mitótico das cinesinas e da dienina citoplasmática (Veith *et al.*, 2005). A regulação de carbono e nitrogênio, nesta espécie, também são bem estudadas. Uma consequência útil destes estudos regulatórios é a caracterização e o desenvolvimento do promotor condicional da álcool desidrogenase (*ALCA*), induzido por álcool ou treonina e reprimido por glicose, como uma ferramenta útil para o controle da expressão gênica (Gwynne *et al.*, 1987; Felenbok, 1991).

As vantagens deste fungo para pesquisas consistem: na presença dos ciclos sexual, assexual e parassexual (Pontecorvo, 1952; Clutterbuck, 1997), ciclo de vida curto, ser haplóide e homotático, onde o ciclo de sexual se completa sem a necessidade de cruzamento entre linhagens sexualmente definidas, além de ser facilmente cultivado em meio de cultura definido a temperatura de 37°C.

1.2 *Aspergillus nidulans* – considerações gerais dos ciclos de vida

O *Aspergillus nidulans* cresce como um fungo filamentosos, de modo rápido, em meios sólido ou líquido, sob condição nutricional variável (Goldman e Kater, 2003). Sua importância, como sistema utilizado na genética e na biologia celular de fungos, se dá pela proximidade genômico/evolutiva com um grande número de outras espécies de *Aspergillus* – por exemplo, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae* e *A. flavus* – com a vantagem de não ser patogênico para indivíduos imunocompetentes (Oka *et al.*, 2004).

Ainda, a utilização do *A. nidulans*, como modelo em análises genéticas, ocorre por ele possuir todos os ciclos de vida dos ascomicetos. Diferentemente de outros fungos filamentosos, *A. nidulans* apresenta três diferentes ciclos proliferativos: assexual, sexual e parassexual. Apenas os dois últimos favorecem a variabilidade genética (van de Vate e Jansen, 1978; Baptista *et al.*, 2003).

O esporo assexual, ou conídio, é vital no ciclo de vida de muitos fungos porque ele é o principal meio de dispersão e proteção para o genoma do fungo, sob condições ambientais desfavoráveis. No *Aspergillus nidulans*, no *Aspergillus fumigatus*, na *Neurospora crassa* e em vários fungos patogênicos de plantas (Osharov e May, 2001), a germinação geralmente é desencadeada pelo sensoramento de nutrientes e é caracterizada pelo intumescimento conidial, adesão, organização nuclear e crescimento da hifa. O *A. nidulans* é um fungo homotático (que realiza autofertilização) com oito cromossomos geneticamente definidos, sendo útil como modelo de estudo de diferentes aspectos de características de desenvolvimento (Timberlake e Marshall, 1988).

O ciclo parassexual envolve, essencialmente, a anastomose de hifas de homocarióticas genotipicamente distintas, resultando em um micélio heterocariótico. A fusão de dois núcleos haplóides distintos resulta em um núcleo diplóide. Após sofrer *crossing-over* mitótico e/ou não disjunção mitótica, o núcleo diplóide pode voltar ao estado haplóide por meio de divisões mitóticas subsequentes (Pontecorvo, 1956; Baptista *et al.*, 2003). A parameiose é a variação do ciclo parassexual na qual a recombinação genética e haploidização podem ocorrer dentro da hifa heterocariótica, antes da produção de conídios. De fato, segregantes haplóides recombinantes são diretamente originados do heterocário e a fase diplóide não é recuperada. O ciclo parassexual com parameiose constitui uma importante ferramenta, para o estudo da ocorrência de trocas genéticas. Em contraste ao processo de resposta longa, requerida no

ciclo parassexual convencional, para formar células recombinantes, a parameiose é uma maneira apropriada para avaliar o *crossing-over* mitótico (Baptista *et al.* 2003; Becker e Castro-Prado, 2006).

O ciclo sexual envolve alteração entre uma a fase haplóide e a diplóide. A duração relativa das fases de ploidia pode diferir entre os taxa. Os extremos são, por um lado, animais diplóides multicelulares e plantas com haploidia restrita à fase de gameta e do outro lado, algas e fungos haplóides com diploidia restrita ao estágio zigoto. A grande variação na predominância do estado diplóide no ciclo de vida de eucariotos não é totalmente compreendida, apesar de existirem vários estudos a este respeito (Kirkpatrick e Jenkins, 1989; Orr e Otto, 1994; Mable e Otto, 2001; Zeyl *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2004). Possíveis vantagens evolutivas do estado diplóide incluem o mascaramento de mutações recessivas deletérias (Kirkpatrick e Jenkins, 1989; Perrot *et al.*, 1991) e rápida adaptação (Orr e Otto, 1994), mas uma taxa maior de adaptação em haplóides também foi encontrada em muitos estudos de leveduras (Zeyl *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2004).

O fungo filamentosso *A. nidulans* é um modelo genético que facilita as comparações entre haploidia e diploidia. Juntamente com o ciclo sexual ele possui, assim como outros fungos, um ciclo parassexual (Pontecorvo *et al.*, 1953). Em micélio crescente, núcleos haplóides podem se fundir, com uma probabilidade de 10^{-6} , para formar núcleos diplóides vegetativos relativamente estáveis. Núcleos diplóides podem espontaneamente produzir recombinantes diplóides por meio de *crossing-over* mitótico e recombinantes haplóides pela repetida perda de metade dos cromossomos, com a probabilidade de 10^{-3} por mitose (Käfer, 1958; Pontecorvo e Käfer, 1958; Clutterbuck, 1970). Portanto, o nível de ploidia do núcleo é polimórfico no micélio de tamanho intermediário a grande.

Em todos os estágios de desenvolvimento, uma pequena fração de seu núcleo existirá no estado diplóide e atuará como uma fonte de núcleos haplóides recombinantes. Se um núcleo diplóide é heterozigoto para algum *loci* (devido a mutações ou quando o micélio é um heterocário), um recombinante haplóide pode conter novas combinações alélicas. Se a adaptação envolve “epistasia assinada” – definida como a interação entre mutações que são individualmente neutras ou deletérias, mas vantajosas quando combinadas – para qual existe crescimento suportado empiricamente (Weinreich *et al.*,

2005), o estágio de diplóide vegetativo pode atuar como um acumulador de mutações recessivas desse tipo.

Combinações vantajosas específicas de mutações podem então aparecer em um núcleo haplóide produzido por recombinação parassexual. Como segregantes haplóides bem sucedidos podem então fixar-se no micélio como um setor contendo então diferenças fenotípicas do resto da colônia. Baseado nestes fatos, Todd e colaboradores (2007) mostraram que a flexibilidade de troca entre diploidia e haploidia em um organismo vegetativo, como provido pelo ciclo parassexual, pode permitir particularmente rápida adaptação se a epistasia assinada estiver envolvida.

1.3 Mecanismos de reparo e recombinação

A habilidade de replicação e de segregação do DNA com alta fidelidade garante a integridade do genoma (Bartek e Lukas, 2007). A resposta aos danos do DNA é um mecanismo protetor que assegura a manutenção da integridade genômica durante a reprodução celular. Quebras nas fitas duplas e simples, os danos básicos e as ligações cruzadas DNA-proteína são alguns dos tipos dos danos causados por causas intrínsecas ou extrínsecas. Caso não ocorra pareamento, os danos do DNA podem resultar na interrupção do ciclo celular, morte celular ou, se reparado incorretamente, na perda da informação genética ou no acúmulo de mutações que conduzem à instabilidade genômica. A replicação do DNA, a transcrição do gene, o reparo do DNA, e o ponto de verificação do ciclo celular devem se intercomunicar para promover a sobrevivência celular e a regulação normal de funções celulares depois dos danos ao DNA (Levitt e Hickson, 2002).

Originalmente, quando o interesse no reparo do DNA em *Aspergillus nidulans* se desenvolveu, principalmente aparte aos estudos sobre recombinação na mitose, respostas induzidas por mudanças ambientais e o controle genético do ciclo celular (Kafer e May, 1997), aspectos importantes destes processos foram identificados como componentes essenciais do fenômeno complexo da resposta aos danos do DNA: a recombinação mitótica celular é reconhecida como um dos processos principais do reparo da ruptura da dupla fita; as respostas induzíveis aos danos do DNA foram demonstradas para vários tipos de enzimas de reparo e a análise do controle genético do ciclo celular revelou os pontos regulatórios de verificação importantes em cada etapa,

para assegurar a conclusão da replicação e do reparo do DNA antes da entrada na mitose (Goldman e Kafer, 2004).

A recombinação homóloga é o processo pelo qual dois cromossomos, emparelhados durante a prófase I da meiose, trocam alguma porção distal de seu DNA. O *crossing-over* ocorre quando dois cromossomos homólogos quebram e então reconectam-se, só que em fitas diferentes. Se quebrarem no mesmo lugar ou *locus* na sequência de pares de bases, o resultado é uma troca dos genes, chamada recombinação genética. Este é o resultado esperado da ocorrência do *crossing-over*. Se quebrarem em *loci* ligeiramente diferentes, o resultado pode ser uma duplicação dos genes em um cromossomo e de uma perda destes no outro. Isto é conhecido como um *crossing-over* desigual. Se os cromossomos quebrarem em ambos os lados do mesmo centrômero e recombinarem excluindo o centrômero, o resultado pode ser um cromossomo perdido durante a divisão celular (Chiuchetta e Castro-Prado, 2002).

É possível que, em qualquer par de cromossomos homólogos possa sofrer *crossing-over* muitas vezes durante a meiose, dependendo da espécie e do comprimento do cromossomo. A recombinação é catalisada na célula, pela maquinaria que foi bem conservada durante a evolução. Isto reduz o enlace genético entre alelos no mesmo cromossomo e aumenta a variação genética dentro de uma população. Esta variedade independente é um processo que opera no conjunto completo dos cromossomos (Clutterbuck, 1997).

A junção final não homóloga do DNA (NHEJ) é uma via usada para reparar rupturas do DNA de dupla fita. A NHEJ é referida como recombinação “não-homóloga” porque as extremidades são ligadas diretamente sem a necessidade de um molde homólogo, em contraste a recombinação homóloga, que requer uma sequência homóloga para guiar o reparo. O termo “Junção final não homóloga do DNA” foi proposto em 1996 por Moore e Haber. A NHEJ é evolutivamente conservada em todos os reinos taxonômicos e é a via predominante de reparo da ruptura da dupla fita em muitos organismos, incluindo alguns eucariotos superiores tais como o ser humano e o rato (Burma *et al.*, 2006). Muitos eucariotos inferiores, tais como a levedura *Schizosaccharomyces pombe* utilizam mais freqüentemente a NHEJ do que a recombinação homóloga (Prudden *et al.*, 2003). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, entretanto, a recombinação homóloga domina quando o microrganismo é cultivado sob

condições padrão de laboratório (Letavayova, *et al.*, 2006). Algumas espécies de bactérias, tais como o *Mycobacterium tuberculosis* (Pitcher, *et al.*, 2005), possuem uma via de junção terminal, enquanto este processo está ausente em outras bactérias, como a *Escherichia coli* (Tachibana, 2004). Em *A. nidulans*, a NHEJ foi recentemente demonstrada por meio da deleção do gene *nkuA*, essencial a NHEJ, levando a aumento na frequência de recombinação homóloga neste fungo (Nayak, *et al.*, 2006).

A NHEJ utiliza tipicamente as sequências homólogas curtas do DNA, denominadas microhomologias, para guiar o reparo. Microhomologias são continuações como fita simples, que freqüentemente estão nas terminações da fita dupla e são usadas para promover o reparo restaurativo. Quando estas continuações de fita simples são compatíveis, a NHEJ repara, quase sempre, a ruptura sem erro, com nenhuma perda da sequência (Moore *et al.*, 1996; Boulton e Jackson, 1996; Wilson *et al.*, 1999; Budman e Chu, 2005). O reparo impreciso que conduz à perda dos nucleotídeos pode também ocorrer, mas é muito menos comum. Não obstante, a NHEJ é freqüentemente referida como um mecanismo “error-prone” (propenso a erros) de reparo. Isto é provável porque a NHEJ pode levar a translocações quando os organismos são submetidos a grandes doses de radiação que causam muitas rupturas de DNA (Delacote *et al.*, 2007). Adicionalmente, a via de NHEJ é responsável por fundir as extremidades dos cromossomos que se sofreram falha no telômero (Espejel *et al.*, 2002). Estas translocações podem resultar em regulação gênica incorreta, e finalmente promover o câncer.

O tamanho do genoma do *A. nidulans* é de aproximadamente 31Mb. Ele possui 8 cromossomos bem mapeados contendo estimados 11.000 a 12.000 genes. Por volta de 900 genes foram identificados em *A. nidulans* por comparação convencional, 432 estão sendo mapeados por *locus* e 254 foram clonados e seqüenciados (Galagan *et al.*, 2005).

A partir da divulgação do sequenciamento genômico do *Aspergillus nidulans* (Projeto RefSeq do genoma do *Aspergillus nidulans* no NCBI; Projeto Sequenciamento do Genoma do *Aspergillus nidulans* no Broad Institute), a biologia computacional tornou-se uma poderosa ferramenta para auxiliar os estudos genéticos, proteômicos, metabólicos e evolutivo deste organismo.

1.4 Tratamento do *A. nidulans* com RNA

A capacidade do *A. nidulans* em realizar processos gênicos como recombinação e reparo, homólogo ou não homólogo, descritos acima, o possibilita ser utilizado em experimentos recombinacionais diversos (Goldman e Kafer, 2004). Os genes de outros *Aspergillus* assim como alguns genes de espécies de mamíferos podem funcionar em *A. nidulans* via transformação mediada por DNA (Oka *et al.*, 2004).

Baseados neste conhecimento, Zucchi e colaboradores (1996) publicaram um trabalho que tinha como objetivo produzir um fator antiinflamatório semelhante ao fator inibitório de recrutamento de neutrófilos (NRIF). Neste trabalho, macrófagos de ratos foram cultivados na presença de lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular de *Escherichia coli*. Estes macrófagos foram então lisados e seu RNA total foi separado e injetado em protoplastos da linhagem UT448 de *Aspergillus nidulans*. Foram selecionadas colônias produzidas após tratamento, que diferiam em cor e/ou morfologia. Após cultivo de conídios destas colônias, seus sobrenadantes foram purificados em coluna de frutose, que seleciona açúcares ou componentes glicosilados produzidos pelos transformantes. O material retido pela coluna foi então usado para tratar peritonite de ratos induzida por carragenina. Apenas duas linhagens foram capazes de produzir algum fator antiinflamatório, que inibia o influxo de células para o peritônio, denominadas então RT1 e RT2.

As alterações genético/fisiológicas produzidas pelo tratamento com RNA exógeno e diversificado, como foi o caso, foi um dos objetos do nosso estudo. Este RNA poderia interferir em diversas vias de regulação gênica, como inserções diretas no DNA, por meio de recombinação homóloga (cDNA) ou não homóloga; RNAi (RNA de interferência) e retrotransposição. Todos estes fatores poderiam ser bloqueados ou facilitados pelos mecanismos de reparo do DNA, que este fungo realiza com alta eficiência.

Estudos recentes em nosso laboratório (Queiroz *et al.*, 2007) investigaram qual fator antiinflamatório foi produzido pela linhagem RT2 de *A. nidulans*, determinaram, por meio de *screening* em edema de pata de camundongos induzido por carragenina, que este fator é uma glicoproteína, com 32% do seu peso composto por carboidratos. Neste trabalho, características bioquímicas da glicoproteína isolada foram determinadas

e sua atividade antiinflamatória testada em um modelo experimental *in vivo*, diferente do usado por anteriormente (Zucchi *et al.*, 1996).

Entretanto, a caracterização desta biomolécula de potencial biotecnológico, necessitava aprofundamento nos estudos bioquímicos e farmacológicos. Para atingir estes objetivos foram utilizados os conhecimentos de bioquímica de glicoproteínas e do processo inflamatório, como base nos estudos aqui desenvolvidos.

1.5 Glicoproteínas de *Aspergillus*

Glicoproteína é uma biomolécula composta por uma porção protéica com a adição de carboidratos. O carboidrato é ligado à proteína durante a modificação pós-traducional (Nozawa *et al.*, 2003) ou a modificação co-traducional (Hefti *et al.*, 2003). A adição de açúcares pode ocorrer no aminoácido asparagina e é denominado N-glicosilação, por se ligar ao nitrogênio da cadeia lateral do resíduo. O açúcar ligado ao oxigênio livre dos aminoácidos serina ou treonina, a ligação é denominada O-glicosilação. Os monossacarídeos comumente encontrados em proteínas de eucariotos são glicose, galactose, manose, fucose, xilose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina e ácido siálico. Esses açúcares podem auxiliar no enovelamento da proteína (Benoit *et al.*, 2006), melhorar a sua estabilidade e aumentar o seu tempo de vida em sistemas biológicos (Eriksen *et al.*, 1998). Geralmente, as glicoproteínas são encontradas no espaço extracelular, já que seu processamento ocorre no Complexo de Golgi (Czlapinski e Bertozzi, 2006).

A tentativa de Zucchi e colaboradores (1996) de purificar compostos bioquímicos glicosilados, produzidos pelo *A. nidulans* não foi suficientemente seletiva. Atualmente, é conhecido que proteínas do sobrenadante deste gênero possuem pelo menos O-glicosilações, que é uma marcação molecular essencial à exportação destas proteínas pelo fungo (Perlińska-Lenart *et al.*, 2005).

A caracterização de glicoproteínas no gênero *Aspergillus* tem revelado que estas proteínas, em sua maioria apresentam-se como N-glicosiladas (Benen *et al.*, 2000), ou seja, as cadeias de açúcares estão ligadas ao aminoácido asparagina no nitrogênio da cadeia lateral do resíduo. O estudo dos efeitos de N-glicosidases verificou que seu sítio de reconhecimento é Asn-Ile/Phe-Thr (Walmsley e Hooper, 2003). O nível de N-glicosilações pode ser muito alto, na ordem de 35%, como encontrado em uma fitase de

Aspergillus niger (Panchal e Wodzinski, 1998). Neste caso, foram identificadas duas isoformas para a enzima, uma não glicosilada e outra N-glicosilada, ambas com atividade similar.

Em contraponto a altas taxas de glicosilação, no trabalho de Colangelo e colaboradores (1999) a expressão da enzima pectato liase de *Aspergillus niger* expressa em *A. nidulans* mostrou um acréscimo de peso molecular de 1200 Da, referente a N-glicosilações contendo manose. Já em um trabalho sobre a enzima leucina amino peptidase, secretada pelo *A. sojae*, foi verificada que N-glicosilações representavam 3% do peso molecular total da enzima (Chien *et al.*, 2002).

1.6 Considerações gerais sobre inflamação

A reação inflamatória é a resposta do organismo a uma agressão local, caracterizada por uma série de eventos complexos, que envolvem vasodilatação arteriolar, seguida de aumento de fluxo sanguíneo, aumento de permeabilidade venular, exudação plasmática e migração leucocitária para o espaço extravascular. A seguir, a eliminação de eventuais agentes injuriantes, pelos fagócitos, são fenômenos centrais do processo, tendo como sequência o reparo e a substituição do tecido lesado. A maior característica da inflamação é que a natureza sensivelmente padronizada de resposta à injúria é uma reação estereotipada, que envolve: rubor, tumor, calor e dor. Assim, qualquer tipo de injúria envolve uma resposta similar independente do fator injuriante (Teixeira *et al.*, 2003). O desenvolvimento destes sinais se deve à ação coordenada de mediadores químicos, liberados no local da lesão (Ryan e Majno, 1977; Lentsch e Ward, 2000; Kolinsky, 2007).

A resposta imediata e inicial a um agente – inflamação aguda – inclui alterações no calibre vascular e no fluxo sanguíneo, mudanças estruturais na microvasculatura que favorecem o extravasamento de proteínas plasmáticas e leucócitos, migração de leucócitos da microcirculação, e seu acúmulo no foco da injúria, seguido por fagocitose por células competentes (Kelly *et al.*, 2007).

Os fenômenos vasculares ocorrem principalmente na rede microcirculatória e iniciam-se com breve vasoconstrição, seguida de vasodilatação e aumento do fluxo local, seguido de aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente extravasamento do

fluido e material protéico, do plasma para o interstício, levando a formação do edema (Garcia Leme *et al.*, 1973).

O componente celular da reação inflamatória é representado, primordialmente, por leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) que migram para o tecido adjacente. Nos primeiros estágios de uma resposta aguda, há predomínio numérico de neutrófilos. Os leucócitos, mobilizados a partir dos compartimentos de reserva e da corrente sanguínea, marginam a superfície dos vasos da microcirculação da área que circunda a lesão (passam a deslizar sobre o endotélio – comportamento de *rolling* e, posteriormente, aderem a parede do vaso. A seguir, essas células migram para o meio extravascular, através de junções interendoteliais (diapedese) e acumulam-se no local da lesão (Florey, 1970).

A migração dos leucócitos do tecido para o local da injúria ocorre de forma orientada por gradiente químico, um processo denominado quimiotaxia. Os leucócitos, presentes no foco inflamatório, fagocitam os agentes injuriantes, seguida pela liberação de produtos microbicidas dentro do fagolisossomo promovendo a morte ou degradação do material fagocitado (Lehr e Arfors, 1994). Após a fagocitose, os neutrófilos rapidamente entram em apoptose e são então fagocitados ou removidos pela rede linfática (Greenberg, 1999; Aderem e Underhill, 1999).

O macrófago é a principal célula diferenciada do sistema fagocítico mononuclear e participa de inúmeros processos fisiológicos e patológicos. Estes leucócitos estão, normalmente, distribuídos em diversos tecidos, tais como o hematopoiético e o linfóide (Gordon, 1992). Estas células se originam na medula óssea, a partir de um precursor comum da linhagem granulocítica (Davies, 1994). Após deixarem a medula, os monócitos permanecem na circulação sanguínea por 70 horas, até migrarem para diferentes tecidos e cavidades, onde se diferenciam em macrófagos teciduais (Johnston, 1988). Estas células permanecem residentes, por alguns meses e podem sofrer a estimulação de agentes inflamatórios e/ou imunológicos adquirindo características próprias, tanto morfológicas quanto funcionais, como a fagocitose e a capacidade microbicida, além do processamento e apresentação de antígenos e interação com o sistema linfóide, com conseqüente produção de anticorpos ou sensibilização de células (Kaiser *et al.*, 1990; Davies, 1994; Graf *et al.*, 1999).

Os eventos celulares, acima descritos, são desencadeados pela ação de mediadores químicos, que são formados pelo metabolismo do ácido araquidônico (AA), ácido 5,8,11,14 eicosatetraenóico – um ácido graxo essencial – é parte integrante de moléculas de fosfolipídeos, triglicerídeos e ésteres do colesterol constituintes das membranas celulares. Frente a estímulos químicos, físicos ou biológicos que aumentam o influxo de cálcio para as células, ocorre a ativação de uma enzima dependente de cálcio, a fosfolipase A₂. Esta enzima hidrolisa fosfolipídeos de membrana na posição 2(R) e libera o ácido araquidônico.

O ácido araquidônico livre, por sua vez, é metabolizado por sistemas enzimáticos, originando uma família heterogênea de substâncias denominadas eicosanóides, que incluem entre elas as prostaglandinas (PG), tromboxanas (TX) e leucotrienos (LT) (Yokomizo *et al.*, 1997; Sarau *et al.*, 1999).

A biossíntese dos prostanóides (prostaglandinas, tromboxana e prostaciclina) é mediada pelas enzimas ciclooxigenases que convertem o ácido araquidônico em intermediários instáveis PGG₂ e PGH₂. Seguido pela conversão de PGH₂ nos produtos finais PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ (prostaciclina), ou tromboxana A₂ (TXA₂), por intermédio de sintases específicas. As prostaglandinas desempenham papel importante na inflamação e hiperalgesia (Portanova *et al.*, 1996).

A PGE₂ é a prostaglandina mais abundante no organismo (Serhan *et al.*, 2003). Este prostanóide é produzido por várias células, incluindo os fibroblastos, leucócitos e células renais. Este mediador lipídico é o principal membro da família das prostaglandinas, pois desempenha função importante em sistemas fisiológicos, como os sistemas gastrointestinal, renal e cardiovascular (Narumiya e Fitzgerald, 2001; Harris *et al.*, 2002). De maneira geral, as prostaglandinas da série E promovem vasodilatação, potenciam o aumento da permeabilidade vascular, causado pela histamina e a bradicinina e estão envolvidas no fenômeno de dor e febre (Portanova *et al.*, 1996; Gerritsen, 1996). No entanto, a PGE₂ pode exercer efeitos opostos, tais como suprimir a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , a interleucina (IL)-1 e a IL-6 (Takayama *et al.*, 2002; Noguchi *et al.*, 2005), inibir a fagocitose por macrófagos (Davidson *et al.*, 1998) e a proliferação de células T (Nataraj *et al.*, 2001).

O papel chave de prostaglandinas na inflamação é corroborado pelo achado de que fármacos antiinflamatórios não-esteroidais suprimem a atividade de ciclooxigenases

e inibem a inflamação *in vivo* (Grosser, 2006). Atualmente, são conhecidas pelo menos três formas de ciclooxigenases, denominadas COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-3 foi recentemente descrita em humanos, córtex canino, medula espinhal de ratos e em camundongos (Willoughby *et al.*, 2000; James *et al.*, 2001; Chandrasekharan *et al.*, 2002; Kis *et al.*, 2004; Kis *et al.*, 2006).

A COX-1, isolada por Helmer e Lands (1976), é a isoforma amplamente distribuída e constitutivamente expressa na maioria das células e tecidos, que incluem o endotélio, monócitos, plaquetas, células renais e vesículas seminais (Botting, 2006). Esta enzima é responsável pela formação de prostanóides que, em condições fisiológicas, são responsáveis pela regulação da homeostasia (Botting e Ayob, 2005). Por outro lado, alguns estudos indicaram que a COX-1 também está envolvida na resposta inflamatória (Ochi e Goto, 2002). Normalmente, a concentração desta enzima é constante, porém, em alguns casos, pequenos aumentos podem ocorrer em resposta a estímulos por hormônios ou fatores de crescimento (Dewitt, 1991; Ueda *et al.*, 1997).

A COX-2 pode ser expressa constitutivamente ou ser induzida em vários tipos celulares e desempenha função fisiológica e fisiopatológica importante (Wu, 2005). A expressão constitutiva dessa isoforma ocorre em algumas áreas do sistema nervoso central (Kis *et al.*, 2006), em tecidos envolvidos na reprodução (durante a ovulação e implantação do blastocisto) (Gibb *et al.*, 1996) e no sistema gástrico (Kargman *et al.*, 1996). Por outro lado, a expressão de COX-2 é reconhecida como um componente chave em patologias de natureza inflamatória, na injúria tecidual e em processos tumorais (Simmons *et al.*, 2004).

A principal linha de regulação fisiológica da inflamação é a produção de glicocorticóides endógenos. O cortisol, que é um hormônio esteróide sintetizado a partir do colesterol, é o principal glicocorticóide secretado pelo córtex da adrenal. Sua via de controle segue o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. O hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que estimula a adenohipófise a produzir o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), este por sua vez, estimula as células da zona fasciculada do córtex das glândulas adrenais a produzir o cortisol. O cortisol, por sua vez, atua como um sinal de retroalimentação negativa, inibidora secreção do ACTH e do CRH (Silverthorn, 2003).

Os glicocorticóides reduzem as manifestações da inflamação. Essa propriedade resulta de seus efeitos profundos sobre a concentração, a distribuição e a função dos leucócitos periféricos, bem como se seus efeitos supressores sobre as citocinas e quimiocinas inflamatórias e outros mediadores lipídicos e glicolipídicos da inflamação.

Após a administração de um glicocorticóide sintético, a concentração circulante de neutrófilos aumenta, enquanto ocorre a redução do número de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos na circulação. Os glicocorticóides também inibem as funções dos macrófagos teciduais e de outras células apresentadoras de antígenos.

Além de seus efeitos sobre a função leucocitária, os glicocorticóides influenciam a resposta inflamatória ao reduzir a síntese de prostaglandinas, leucotrienos e fator de ativação plaquetária, que resulta da ativação da fosfolipase A2.

Os glicocorticóides apesar de exercerem efeitos antiinflamatórios, quando introduzidos pela primeira vez, foram considerados a última resposta ao tratamento de inflamações. Infelizmente, a toxicidade associada à terapia crônica com corticosteróides limita seu uso. Por conseguinte, os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) assumiram o principal papel no tratamento da inflamação (Katzung, 2006).

AINEs são os fármacos mais usados no tratamento da dor e inflamação e representam uma das classes mais comuns de medicamentos usados no mundo, com uma estimativa de que mais de 30 milhões de pessoas por dia utilizam este tipo de medicamento (Singh e Triadafilopoulos, 1999). AINEs não seletivos inibem tanto COX-1 (constitutiva) quanto COX-2 (induzível), enzimas envolvidas na produção de prostaglandinas e tromboxana.

A premissa de que a COX-1 realiza funções de manutenção celular para a atividade fisiológica normal e é a isoforma predominante expressa em plaquetas e no trato gastrointestinal, considerando que, COX-2 atua nos sítios inflamatórios, ela tem sido o alvo para o desenvolvimento de inibidores seletivos. O efeito renal de AINEs não seletivos, ligado a inibição de COX-1, levou ao aumento do uso de AINEs seletivos para COX-2, que mantém a modulação fisiológica e fisiopatológica das funções renal e cardiovascular, levando a uma maior aceitação no mercado a AINEs seletivos para COX-2 (Harris e Breyer, 2006).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as alterações genotípicas e fenotípicas na linhagem RT2 do fungo *Aspergillus nidulans*, após o tratamento com RNA total de macrófagos de ratos, que levaram a modificação fenotípica desta linhagem e quanto a um destes novos fenótipos resultantes, uma glicoproteína (Nandina) com atividade antiinflamatória *in vivo* e *in vitro*.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Avaliar as alterações estruturais no genoma da linhagem RT2 de *Aspergillus nidulans*.
- ✓ Avaliar as alterações fenotípicas ocorridas nesta linhagem.
- ✓ Purificar a glicoproteína antiinflamatória produzida por esta linhagem.
- ✓ Caracterizar bioquimicamente esta glicoproteína.
- ✓ Caracterizar *in vivo* e *in vitro* a atividade antiinflamatória da Nandina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens de *Aspergillus nidulans*

A linhagem UT448, originalmente dos estoques de Glasgow (Reino Unido), foi adquirida dos estoques de Utrecht (Holanda). Esta linhagem possui como marcadores - *wA2* (II), conídio branco; *riboA1*, *pabaA124*, *biA1* (Cromossomo I), com requerimentos para riboflavina, ácido *p*-aminobenzoico e biotina, respectivamente; *AcrA1* (Cromossomo II), resistência à acriflavina.

A linhagem RT2 foi obtida por meio do tratamento dos protoplastos da linhagem UT448 com RNA total de macrófagos de ratos (Wistar) estimulados com LPS. (Zucchi *et al.*, 1996). Esta linhagem revelou-se prototrófica para todos os marcadores genéticos e resistente a acriflavina. A cor dos conídios desta linhagem é verde.

3.2 Cultivo das linhagens

A formulação do meio mínimo (MM) seguiu o protocolo descrito por van de Vate e Jansen (1978). Para cada litro do meio de cultura foram usados 6 g de nitrato de sódio, 0,52 g de sulfato de magnésio, 0,52 g de cloreto de potássio, 1,52 g de fosfato de potássio, 1mg de sulfato de ferro, 1 mg de sulfato de zinco, 1mg de sulfato de cobre, 10 g de glicose e água destilada 1 L q.s.p..

Para a formulação do meio completo (MC) seguiu-se a mesma metodologia sendo utilizado meio mínimo adicionado de 2 g de peptona, 1 g de casaminoácidos, 2 mL de solução de vitaminas (ANEXO) e 2,5 mL de solução de ácidos nucleicos de levedura, hidrolisados (ANEXO).

Para o teste das linhagens, no que se refere aos marcadores de auxotrofia, as linhagens foram cultivadas em meio seletivo (SM), que consistiu do uso de MM suplementado com riboflavina (1,0 µg/mL), ácido *p*-aminobenzoico (0,685 µg/mL) ou biotina (0,002 µg/mL). Para teste de resistência ao fungicida acriflavina, que corresponde a um marcador genético no Cromossomo II, foram adicionados 5 µg/mL de acriflavina ao meio SM.

O cultivo destas linhagens foi sempre realizado em um meio de cultura com pH 6,0. A temperatura de incubação foi de 37 °C. Para obtenção de um meio de cultura sólido, foi usado ágar a 1,2%. Este meio sólido foi usado para manter as colônias em estoque a 4 °C ou para o desenvolvimento de colônias em placas de petri, o meio de cultura líquido foi usado para obtenção de micélio ou obtenção das proteínas do sobrenadante das culturas das linhagens.

3.3 Detecção de polimorfismos gênicos nas linhagens UT448 e RT2 de *Aspergillus nidulans* por meio de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)

As colônias de ambas linhagens foram submetidas ao processo de extração do DNA genômico pelo método CTAB, conforme relatado adiante, a fim de se averiguar a possibilidade de alteração no genoma do fungo. Uma ferramenta rápida e de alto valor informativo é a técnica de Amplificação de Segmentos de DNA ao Acaso (RAPD), proposta por Williams *et al.* (1990).

3.3.1 Cultivo dos isolados para extração do DNA genômico

Para obtenção de DNA genômico para a análise de polimorfismos genéticos entre as linhagens UT448 (parental) e RT2 (RNA-modificada) de *A. nidulans*, os conídios das linhagens foram inoculados em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio líquido completo (MC). Os frascos foram levados ao agitador orbital, a 37 °C, sob rotação de 180 r.p.m. Após 48 horas de incubação, o micélio foi recuperado por filtração a vácuo, lavado com água destilada estéril para remover todo resíduo do meio de cultura, liofilizado e estocado a -80 °C.

3.3.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi obtido pelo uso do protocolo de extração de DNA CTAB (Doyle e Doyle, 1987) em micélio liofilizado. Utilizaram-se 40 mg de micélio por tubo (2,0 mL), para extração do DNA genômico total. O micélio liofilizado foi macerado em cadinho de porcelana e ao tecido macerado foram adicionados 600 µL de tampão de extração (acrescido de mercaptoetanol). A mistura foi incubada a 65°C, por 30 minutos, com leve agitação a cada 10 minutos. As amostras foram então levadas à capela de exaustão para remoção da fase orgânica, que foi feita através da adição de 600 µL de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1). Os tubos foram agitados por cinco minutos e centrifugados a 12.000 rpm, por 5 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para tubos esterilizados. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de 500 µl de isopropanol absoluto. Uma nova centrifugação deu-se a 12000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado duas vezes com etanol 70% e submetido a lavagens com acetado de amônio. Em seguida, adicionou-se tampão TE e incubou-se, por 30 minutos, com 12 U de RNase.

A quantificação do DNA extraído foi feita em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,25 µg/mL), sendo utilizado como padrão comparativo de peso molecular, o DNA do fago *lambda* (GIBCO).

3.3.3 Seleção de iniciadores aleatórios

O Laboratório de Biotecnologia Genômica da Universidade Católica de Brasília possui um banco de 40 iniciadores aleatórios (Life Technologies Brasil Ltda) que foram testados em *A. nidulans*. Deste conjunto de iniciadores, foram selecionados 7, que apresentaram alto polimorfismo em RAPD, em ensaios pilotos com os diplóides originais. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen e a sequência de bases encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Seqüência nucleotídica dos iniciadores utilizados no RAPD.

Iniciadores	Seqüência (5' - 3')
OPC20	ACT TCG CCA C
OPG10	AGG GCC GTC T
OPJ20	AAG CGG CCT C
OPK10	GTG CAA CGT G
OPM20	AGG TCT TGG G
OPQ20	ACA CAC GTC G
OPV10	GGA CCT GCT G

Iniciadores confeccionados pela empresa Life Technologies Brasil Ltda - 10 mM a partir das seqüências originais da OPERON Technologies.

3.3.4 Condições da Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 10µL, contendo: 0,4 µL de iniciadores, 7,5 ng de DNA genômico, 200 µM de cada um dos 4 dNTPs, 1X tampão Taq: 1U Taq DNA polimerase (Phyneutria) e 1mg/mL de BSA. As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer Applied Biosystems 9700, programado para um primeiro ciclo a 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos de desnaturação de 94 °C 1 minuto, anelamento do iniciador a 36 °C por 1 minuto e a extensão a 72 °C por 2 minutos, um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 minutos, seguida por um “slot” de 4 °C por 24 horas. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em géis de 1% de agarose com brometo de etídeo (0.5 µg/mL) e visualizados em transiluminador de luz ultra-violeta, usando o sistema de fotodocumentação de géis Kodak Analysis System 120. Os tamanhos dos produtos de PCR foram estimados, usando-se marcador de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen).

3.3.5 Análise dos dados genômicos

Na avaliação dos géis, a presença de uma banda em um indivíduo foi assinalada como 1, ausência por 0 e as eletroforeses falhas foram desconsideradas na análise. Construiu-se uma matriz dos indivíduos analisados. As estimativas das similaridades genéticas (SG) entre os indivíduos analisados foi feita pelo Coeficiente de

Similaridade Jaccard e Simple Matching, fornecido pelo programa MVSP (Multi-variate Statistical Package), através da expressão: $SG = a / a + b + c$, onde:

VARIÁVEIS	1	0
1	A (1,1)	B (0,1)
0	C (1,0)	D (0,0)

O programa MVSP fornece a representação simplificada das similaridades através de um dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA (“unweighted pair group analysis, using arithmetic means”).

3.4 Cultivo das linhagens para produção de proteínas

Os conídios (10^6) das linhagens RT2 e UT448 foram cultivados em meio líquido de extrato de malte (1,5) e glicose (1%), sendo que para a linhagem UT448 foi adicionado 2mL da solução de vitaminas, por 48 h a 37 °C em um agitador orbital. Após este período o micélio foi separado do sobrenadante via filtração em papel de filtro previamente esterilizado seguido por uma filtração a vácuo em sistema estéril com membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 µm. O sobrenadante foi então resfriado e as proteínas foram concentradas por precipitação adicionando ao sobrenadante ácido Tricloroacético (TCA, 50%), na proporção 1:1, mantendo em gelo por 1h e em seguida centrifugado a 5000 rpm por 1h a 4 °C. O precipitado foi lavado 3 vezes com acetona gelada e deixado secar a temperatura ambiente.

3.5 Purificação protéica do sobrenadante das linhagens de *A. nidulans*

Como a linhagem RT2 mostrou-se totalmente prototrófica, os conídios (10^6) desta linhagem foram cultivados em meio líquido de extrato de malte (1,5) e glicose (1%) por 48h a 37 °C em um agitador orbital. Após este período o micélio foi separado

do sobrenadante via filtração em papel de filtro previamente esterilizado seguido por uma filtração a vácuo em sistema estéril com membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 µm. O sobrenadante foi então congelado, liofilizado e mantido a -20 °C até as etapas subseqüentes.

3.5.1 Gel-Filtração

O método de Gel-filtração foi usado para selecionar proteínas do sobrenadante da cultura do fungo ao mesmo tempo em que, limpou as impurezas provenientes dos meios de cultura utilizados. Esta etapa foi desenvolvida utilizando um sistema Fast Protein Liquide Chromatography (FPLC – Pharmacia, Upsalla, Sweden), em uma coluna de exclusão molecular Superdex 75 (60 X 1,6 cm, Pharmacia), previamente equilibrada com bicarbonato de amônia 50 mM, pH 8,5 e eluída de modo isocrático a um fluxo de 0,5 mL/min. Amostras de 1 mL foram coletadas automaticamente.

3.5.2 Cromatografia de exclusão molecular em sistema HPLC

O método de cromatografia de exclusão molecular foi utilizado para refinar a gel filtração em Superdex 75. Para tal, foi utilizada uma coluna TSK3000SW (60 X 0,75 cm, Toso, Tokyo, Japão) em sistema de cromatografia de alta precisão (HPLC) previamente equilibrada com bicarbonato de amônia 50 mM, pH 8,5 e eluída de modo isocrático a um fluxo de 1 mL/min. O eluído foi lido em absorvância de 280 nm e as amostras foram coletadas manualmente.

3.5.3 Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC

A amostra coletada da cromatografia de exclusão molecular mostrou-se parcialmente purificada por análise de banda, em eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em condições desnaturantes. Foi, portanto utilizado a técnica de fase reversa em HPLC, onde, as proteínas foram separadas pela sua hidrofobicidade, já que possuíam peso muito próximo. Para tal, foi usada uma coluna C18-luna (250 X 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, Estados Unidos), em um fluxo de 1 mL/min, utilizando como fase móvel: A) ácido trifluoroacético (0,05%) e B) Acetonitrila (99,9%) e ácido trifluoroacético (0,1%), em gradiente de 0 a

100 do tampão B em 25 min. A absorvância do eluato foi monitorada em 280 nm e as amostras foram coletadas manualmente.

3.6 SDS-PAGE

A eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada como descrito por Laemmli (1970) em gel unidimensional de poliacrilamida a 12% na presença do detergente SDS (0,1%) e corado posteriormente com nitrato de prata (ANEXO). O peso molecular das bandas reveladas no gel foi determinado por medida relativa em comparação com o padrão de peso molecular pré-corado (BIO-RAD): miosina (197,7 KDa), β -galactosidase (126,3 KDa), albumina bovina sérica (81,1 KDa), anidrase carbônica (40,2 KDa), inibidor de tripsina da soja (31,2 KDa), lisozima (17,1 KDa) e aprotinina (6,7 KDa).

3.7 Sequenciamento *De Novo* em espectrometria de massa

As análises em espectrometria de massa foram realizadas em um espectrômetro “quadrupole time-of-flight” (tempo de voo em quadrupolo - Q-Tof) (Micromass, Manchester, UK) equipado com uma fonte de íon Z-spray. O espectro foi coletado em um modo de íon positivo com a voltagem do capilar a 3.1 kV. A voltagem do cone da amostra foi varrida de 20 a 70 V, visto que a voltagem do cone da extração foi mantida constante em 4 V em todos os experimentos. As temperaturas da fonte e da desolvatação foram ajustadas em 110 e 275 °C, respectivamente. N₂ foi usado como gás nebulizante e as taxas do gás de desolvatação e nebulização foram mantidas a 250 e 15 L/h, respectivamente. O espectrômetro de massa foi controlado usando o software MassLynx.

Sequenciamento *De Novo* de peptídeo é uma alternativa rápida à pesquisa em base de dados (embora, em alguns casos, isto produza resultados menos acurados). A maioria de algoritmos *De Novo* modela todos os peptídeos possíveis em um gráfico de espectro, um gráfico acíclico direto com os vértices que correspondem às massas estimadas (locais de clivagem) do peptídeo (Dancik *et al.*, 1999). Dois vértices são conectados por uma borda dirigida do vértice com a massa mais baixa, a essa adiciona-

se uma massa mais alta se a diferença entre elas for igual a massa de um aminoácido, este método identifica cada resíduo pela sua massa. Dancik e colaboradores (1999) descrevem em detalhe a construção e valores do gráfico do espectro. Desde que a fragmentação do peptídeo está freqüentemente incompleta, o gráfico do espectro pode ser descontínuo. Por esta razão, são adicionadas as bordas que correspondem às massas dos pares dos aminoácidos. Com a resolução de FTMS (Fourier transform mass spectrometry), é possível usar bordas de até três aminoácidos (que compensam até duas clivagens faltantes consecutivas da seqüência) sem aumento significativo na complexidade computacional.

3.8 Ensaios *in vivo* do efeito antiinflamatório

3.8.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos entre 18 e 20 g obtidos do Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos em salas com temperatura e luz controladas e receberam água e alimentação *ad libitum* até a realização dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Experimentação Animal do Instituto Butantan (protocolo nº 426/07), que estão de acordo com os procedimentos recomendados pela *Universities Federation for Animal Welfare*.

3.8.2 Edema de pata induzido por Carragenina

O edema de pata foi induzido pela administração de carragenina a 1%, diluída em solução salina (0,9%), no coxim plantar de uma das patas posteriores de camundongos, em volume de 50 µL, segundo o método descrito por Lo Verme (2005). A pata contralateral (controle) recebeu igual volume de solução salina. Quinze minutos após injeção da carragenina, os animais receberam injeção intravenosa (i.v.) de Nandina (10 µg/100 µL), diluída em salina apirogênica. O grupo controle recebeu solução de albumina de soro bovino (10 µg/100 µL) (i.v.), diluída em salina apirogênica.

Os volumes das patas posteriores foram avaliados em um pletismômetro, conectado a um transdutor de pressão, acoplado a um registrador digital (Ugo Basile,

Itália), de acordo com o método descrito por Van Arman e colaboradores (1965). Para tanto, as patas foram imersas, a cada hora, até a articulação tíbio-társica, em uma solução lauril sulfato de sódio (500 mg/L NaCl 18,6 %), num intervalo de 1 a 6 horas, após a injeção da carragenina. A porcentagem de aumento do volume podal foi determinada pela razão entre os volumes da pata experimental (injetada com carragenina) e da pata controle (injetada com solução salina).

3.8.3 Estudo do efeito da Nandina sobre o influxo leucocitário peritoneal

Para o estudo de influxo leucocitário foi utilizado um modelo experimental, modificado, baseado no trabalho descrito por Di Rosa e Sorrentino (1979). A carragenina 0,3%, diluída em PBS apirogênica, foi injetada na cavidade peritoneal dos camundongos (i.p.), em volume de 0,5 mL/cavidade. Os animais do grupo controle receberam volume equivalente de PBS apirogênico, por via i.p. Os camundongos receberam, ainda, injeção intravenosa (i.v.) de Nandina (10 µg/100 µL), ou PBS estéril aos 30 minutos antes e, 1, 2, 3 ou 6 h após a administração da carragenina. Os animais foram sacrificados em uma câmara com concentração tóxica de gás carbônico, após 6 ou 96 horas da injeção de carragenina. Estes períodos correspondem ao pico de influxo de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares, respectivamente. Os leucócitos totais foram coletados por lavagem da cavidade peritoneal com 2 mL de PBS contendo heparina (10 U/mL). Alíquotas dos lavados foram usadas para determinar a contagem total de células, após diluição (1:20, v/v) em solução de Turk, em câmara de Neubauer, ao microscópio de luz. Para a contagem diferencial das células, preparações realizadas em citocentrífuga foram coradas com o corante Hema³ (Fisher Scientific) e analisadas em microscópio de luz. A contagem diferencial foi realizada em pelo menos 100 células, que foram classificadas em células polimorfonucleares e mononucleares, com base em critério morfológico convencional.

3.8.4 Tratamento farmacológico para a inibição da ação de glicocorticóides endógenos

Para avaliar a ativação do eixo hipófise-hipotálamo-adrenal, pela Nandina, foi utilizado um antagonista do receptor de glicocorticóide o RU 38486, conhecido também como mifepristona (Sigma-Aldrich Company, USA). Este composto foi diluído em

etanol 50 % (v/v) e administrado na dose de 30 mg/kg⁻¹ pela via intravenosa (i.v.), em volume constante de 50 µL, uma hora antes da injeção da carragenina (i.p) (Bucci *et al.*, 2000). Após 30 minutos a Nandina (10 µg) diluída em 100 µL de salina ou solução salina (100 µL) foram injetadas i.v.. Aguardado mais 30 minutos, o edema de pata foi induzido pela injeção de carragenina (1%). Os animais controle receberam volume equivalente do diluente utilizado. A avaliação do edema de pata foi realizada de acordo com o descrito no item 3.8.2, por um período compreendido entre a primeira e a sexta hora após a indução do edema.

Figura 3.1: Estrutura química do RU 38486.

3.9 Ensaios do efeito antiinflamatório da Nandina em modelos experimentais *in vitro*

3.9.1 Coleta de macrófagos peritoneais e protocolo experimental para os ensaios *in vitro*

Para os estudos *in vitro*, os macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal. Para a coleta das células, os animais foram mortos em câmara de CO₂ e a cavidade peritoneal lavada com 2 mL de solução salina apirrogênica. Após a coleta e homogeneização do líquido de lavagem, uma alíquota foi diluída em solução de Turk (1:20; v/v), para a contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer e microscopia de luz. A predominância de macrófagos (>95%) foi confirmada em esfregaços celulares corados com Hema³ (Fisher, USA). Uma alíquota contendo 2x 10⁵ células foi então centrifugada a 800 rpm, por 6 minutos, a 22 °C. O precipitado celular foi ressuspenso em meio de cultura RPMI (Sigma-Aldrich Company, USA) e incubados em placas de 96 poços. Os macrófagos foram incubados com Nandina (10; 1; 0,1; 0,01 µg/mL) ou com RPMI apenas e, em seguida, após 30 min, o LPS (1 µg/mL) foi

acrescentado ao meio de cultura. Decorridos 8 ou 24 h de incubação, a suspensão celular foi centrifugada a 800 rpm, por 6 minutos, a 22 °C. O precipitado celular resultante foi utilizado para a análise da expressão das COX-2 e COX-1, por *western blot* e o sobrenadante, para a dosagem de PGE₂, por ensaio imunoenzimático específico (EIA).

3.9.2. Determinação do efeito citotóxico

3.9.2.1 Análise da liberação da lactato desidrogenase (LDH)

A atividade enzimática da LDH, presente no sobrenadante das culturas, foi tomada como parâmetro da viabilidade celular. Neste estudo, foram analisadas concentrações de 10, 1 e 0,1 µg/mL de Nandina. Após cada período de incubação (8 e 24h), o sobrenadante foi retirado e centrifugado a 200 x g, por 6 minutos. A seguir, 30 µL do sobrenadante foram adicionados a outras placas de cultura de 96 poços, acompanhados da adição de 200 µL do substrato, em tampão fosfato contendo: NaCl 200 mM, NADH 0,2 mM, piruvato 1,6 mM/poço. A leitura da D.O. foi realizada a 340 nm, no intervalo de tempo entre 0 e 10 minutos. Os resultados foram expressos pelo decréscimo da D.O., resultante da oxidação do NADH, na presença de piruvato, em relação ao tempo zero.

3.9.2.2 Ensaio da redução do brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2il 2,5-difenil tetrazol (MTT)

A atividade metabólica dos macrófagos peritoneais isolados foi avaliada pelo método da redução do MTT. Neste estudo, foram analisadas concentrações de 10 a 0,1 µg/mL de Nandina. Após cada período de incubação (8 e 24 h), as células foram centrifugadas a 200 x g, por 10 minutos, e o sobrenadante de cada amostra foi retirado. A seguir, foram acrescentados, em cada poço, 100 µL de meio RPMI e 10 µL de MTT em solução a 5 mg/mL, tamponada. Em seguida, os macrófagos isolados foram incubados a 37 °C, em estufa a 5% de CO₂, por 3 horas. Para dissolver os cristais de formazan, oriundos da redução do MTT pelas células viáveis, foram adicionados 100 µL de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 5%, em HCl 0,01 N. As placas foram então incubadas por mais 18 horas. Após este período, a densidade ótica (D.O.) foi determinada a 540 nm, em espectrofotômetro. A viabilidade foi definida como a

porcentagem de diminuição da D.O., observada na monocamada submetida à ação dos agentes, em relação à monocamada controle.

3.9.3 Análise por Western blot

Os precipitados celulares, obtidos como descrito no item 3.9.1, foram lisados com 20 µL de tampão de amostra (Laemmli, 1970) (SDS 20%; glicerina; β-mercaptoetanol 1 M; tampão Tris 1 M pH 6,8; Azul de bromofenol a 0,1%) e aquecidas a 100°C, por 10 minutos.

As proteínas, contidas em alíquotas de 10 µL de amostra, foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE). Para tanto, foi aplicada uma voltagem constante de 150 V. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas, em sistema tamponado, para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, UK), com uma voltagem de 100 V, durante 90 minutos, a 4°C. Os sítios inespecíficos, da membrana de nitrocelulose, foram bloqueados por uma solução contendo leite desnatado a 5% em tampão de lavagem (10% Tween-20, pH 7,4), durante 1 hora. A seguir, para a detecção de COX-1 e COX-2, as membranas foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-COX-1 (Cayman Co., USA) ou COX-2 (Cayman Co., USA) (diluição 1:1500 v/v e 1:2000 v/v, respectivamente), durante 1 hora. Em seguida, foi adicionado um segundo anticorpo, conjugado à peroxidase, para a detecção das COX-1 e -2 (anti-IgG de camundongo, 1:1500 v/v e anti-IgG de coelho, 1:2000 v/v) (GE Healthcare, UK), durante 1 hora. Para o controle do *western blot*, as membranas foram incubadas também com anticorpo monoclonal anti-β-actina (Sigma Aldrich Company, USA) na diluição de 1:2000 v/v e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (GE Healthcare, UK) na diluição de 1:1500 v/v.

As bandas imunoreativas para as COXs foram reveladas por quimiluminescência, com solução de luminol (GE Healthcare, UK) e, em seguida, reveladas em filme (GE Healthcare, UK), em câmara escura. As densidades das bandas foram determinadas pelo Densitômetro GS 700 (Bio Rad Laboratories, USA) utilizando o programa de análise Molecular Analyst® (Bio Rad Laboratories, USA) e normalizadas a partir das densidades das bandas de β-actina.

3.9.4 Quantificação PGE2 por ensaio imunoenzimático específico (EIA)

A dosagem de PGE_2 foi determinada de acordo com o protocolo do fabricante do kit comercial (Cayman Chemical, USA). Resumidamente, os sobrenadantes obtidos segundo a descrição do item 3.9.1, foram diluídos, primeiramente, em tampão específico, numa proporção 1:150 (v/v). Alíquotas contendo 50 μL de cada amostra foram adicionadas às placas de 96 poços, e em seguida, incubadas com igual volume de PGE_2 conjugada à acetilcolinesterase e com antisoro específico de coelho. Após 18 horas de incubação, a 4 °C, o substrato (reagente de Ellman) foi adicionado e a absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro de microplaca (Labsystem Multiscan) a 405 nm. As concentrações foram estimadas a partir da curva padrão específica em concentrações em pg/mL e multiplicadas pelo fator de diluição correspondente.

3.10 Análises estatísticas

As médias e o desvio padrão de todos os dados foram obtidos e comparados por ANOVA two-way, seguido pelo teste de Tukey com níveis de significância probabilística (p) menores que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Comparação entre as linhagens UT448 e RT2 de *Aspergillus nidulans*

4.1.1 Análise fenotípica

As linhagens de *Aspergillus nidulans* foram cultivadas em meio seletivo (SM), sem adição de riboflavina, ácido p-aminobenzoico ou biotina, ou com adição de acriflavina, por 48h a 37 °C e apresentaram o seguinte fenótipo:

Tabela 4.1: Teste de auxotrofia para marcadores genéticos e expressão fenotípica das linhagens UT448 e RT2 em SM.

Linhagem	Ribo	paba	bio	acr	Cor dos conídios
UT448	-	-	-	R	Branco
RT2	+	+	+	R	Verde

A coloração dos conídios de *A. nidulans* depende de fatores genéticos e ambientais. Nos fatores ambientais onde está incluído o requerimento de elementos traço como o cobre (Kurtz e Champ, 1981). Nos fatores genéticos estão incluídos os genes *w*, *y* e *cha*, sendo na condição em que o gene *w* é recessivo (*w*-), o conídio não apresenta coloração (conídio branco). No caso do gene *w* dominante (*w*+) o conídio apresenta coloração, mas esta depende da expressão dos outros genes *y* e *cha*. Quando a linhagem é portadora, no cromossomo I, do alelo mutante *yA2*, o conídio apresenta coloração amarela. E quando o gene *yA2*⁺ está presente, a cor do conídio depende do gene *cha*. O gene *cha*, que está no cromossomo VIII, quando recessivo resulta em um conídio que apresenta um fenótipo verde claro, denominado “chartreuse”. E na presença do alelo selvagem *cha*⁺, o conídio apresenta fenótipo verde.

Figura 1: Fotografias digitais das linhagens de *Aspergillus nidulans* A) UT448 e B) RT2, cultivadas em MC a 37 °C, por um período de 96 horas.

Sem testes adicionais, não é possível determinar fenotipicamente todo o genótipo da linhagem UT448, em relação à coloração do conídio pelo mesmo apresentar coloração branca (Figura 1A). Entretanto, a linhagem RT2, por possuir fenótipo do conídio verde (Figura 1B), apresenta genótipo: *w*⁺, *y*⁺ e *cha*⁺. Isto pode nos levar a crer que a linhagem UT448 também é *y*⁺ e *cha*⁺. Entretanto o fato mais curioso é a confirmação de que a introdução do RNA de ratos levou à modificação da expressão gênica no fungo revertendo *w*⁻ para *w*⁺.

4.1.2 Análise genotípica das linhagens estudadas via DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA)

Esta técnica permite analisar a diversidade genética entre populações e o polimorfismo molecular. Este polimorfismo é de natureza binária, uma vez que a técnica realiza amplificações arbitrárias de segmentos do DNA, através de seqüências iniciadoras (iniciadores), em reação de polimerase em cadeia (PCR), sendo que as evidências experimentais indicam que uma mutação em apenas um par de bases acarreta a não complementaridade dos iniciadores (Ferreira e Grattapaglia, 1998), gerando perfis diferenciados. Deste modo, podemos detectar a ausência ou presença de um segmento amplificado. RAPD é um marcador genético dominante, pois só realiza amplificação no alelo dominante, não sendo possível distinção entre as classes de alelos dominantes homozigotos e heterozigotos. A técnica faz uma cobertura ampla do genoma que, aliada à simplicidade e rapidez na geração de dados, permite a detecção de polimorfismo em nível de DNA (Williams *et al.*, 1990). Esta ferramenta prestou-se à detecção de variação no genoma do fungo, causada por mutações pontuais, inserções, recombinações ou quaisquer outros eventos que alterem a seqüência genômica.

A tipificação genética das linhagens de *A. nidulans* utilizadas no presente trabalho (UT448 e RT2) foi realizada por meio da geração de *fingerprints* de RAPD, com um conjunto de 7 iniciadores randômicos (Tabela 1). Nos géis, bem como nas análises, foram incluídas duas amostras de *Aspergillus flavus* (F5), como controle da tipificação. As amostras foram analisadas utilizando dois métodos de coeficientes de similaridade: Jaccard e *Simple Matching*, que empregam uma análise de agrupamento do tipo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*), cujo critério para a formação dos grupos é a média das distâncias entre todos os pares de

itens que formam cada grupo. Os valores próximos a 1 indicam elevada semelhança entre as amostras.

Em ambos os coeficientes, as amostras relativas ao gênero *A. nidulans* alocaram-se distintamente de *A. flavus*, indicando que a análise interespecífica foi alcançada, garantindo assim, a segurança dos dados (Figura 5). No coeficiente de Jaccard, as amostras UT448 e RT2 apresentaram coeficiente de semelhança genética de 0.741; já no coeficiente *simple matching*, o coeficiente de semelhança genética foi de 0.806, indicando que a análise das linhagens, utilizando RAPD com um conjunto de 7 iniciadores (Figuras de 2 a 6), evidenciou marcadores genéticos, capazes de promover a identificação de regiões polimórficas nas linhagens, entretanto, estas diferenças não foram suficientes para diferenciá-las em linhagens distintas.

Figura 2: Perfis de amplificação por RAPD para os iniciadores OPQ20 e OPC20. Nas canaletas 1, 5 e 9 estão os marcadores 1 Kb plus (Invitrogen). Nas canaletas subsequentes, as linhagens de *Aspergillus nidulans*: 2 e 6 RT2; 3 e 7 UT448; 4 e 8 isolado F5 de *A. flavus*. O uso do *primer* Q20 revelou um polimorfismo da linhagem RT2 em relação a UT448 nas bandas de 600pb e de 1200pb.

Figura 3: Perfis de amplificação por RAPD para os iniciadores OPG10 e OPM20. Nas canaletas 1 e 8 estão os marcadores 1 Kb plus (Invitrogen). Nas canaletas subsequentes, as linhagens de *Aspergillus nidulans*: 2 e 5 RT2; 3 e 6 UT448; 4 e 7 Isolado F5 de *A. flavus*. O uso do *primer* M20 revelou um polimorfismo da linhagem RT2 em relação a UT448 na banda de 500pb.

Figura 4: Perfis de amplificação por RAPD para os iniciadores OPJ20, OPV10 e OPK10. Nas canaletas 1 e 11 estão os marcadores 1 Kb plus (Invitrogen). Nas canaletas subsequentes, as linhagens de *Aspergillus nidulans*: 2, 5 e 8 RT2; 3, 6 e 9 UT448; 5, 7 e 10 isolado F5 de *A. flavus*. Por falhas na eletroforese o *primer* K10 foi desconsiderado nas análises de agrupamento.

4.1.3 Análise de Agrupamento

Figura 5: Dendrogramas gerados a partir dos perfis de RAPD para análise interespecífica e intraespecífica. Em (A) Coeficiente de similaridade estimado por análise *Simple Matching* Coeficiente e em (B), estimado a partir do Coeficiente de Jaccard.

A Figura 5, A e B, exibe as análises de agrupamento para os coeficientes de *Simple Matching* e Jaccard, respectivamente. Em ambos os coeficientes as amostras relativas ao gênero *A. nidulans* alocaram-se distintamente de *A. flavus*, indicando que a análise interespecífica foi alcançada, garantindo assim a segurança dos dados. Em ambos os coeficientes as amostras das linhagens UT184 e UT448 de *A. nidulans* estão distintamente posicionadas e as linhagens UT448 e *DpII-I* (denominada, no gráfico como Z1) apresentaram coeficiente de semelhança genética de 1, indicando que não foi possível, utilizando RAPD e o conjunto de 7 iniciadores, encontrar marcadores genéticos que fossem capazes de promover a distinção destas linhagens, o que é esperado, uma vez que *DpII-I* é uma linhagem oriunda da indução de mutagênese (com

MNNG) da linhagem UT448. Da mesma maneira, os diplóides Z1//UT184 e UT448//UT184 encontram-se próximos, mas distinto das linhagens haplóides.

Estas análises mostram que o método de análise, por meio da geração de *fingerprints* de RAPD utilizando um conjunto de 7 iniciadores randômicos, é capaz de distinguir tanto espécies do gênero *Aspergillus*, quanto linhagens da espécie *Aspergillus nidulans*.

- Coeficiente de Jaccard

Figura 6: Dendrograma gerado a partir dos perfis de RAPD, analisando 36 variáveis em 3 casos, para as linhagens tipificadas. Coeficiente de similaridade estimado a partir do Coeficiente de Jaccard. O dendrograma indica similaridade de 0,043 entre F5 de *A. flavus* e as linhagens de *A. nidulans*. Já entre as linhagens de *A. nidulans*, a similaridade é de 0,741.

- Simple Matching

Figura 7: Dendrograma gerado a partir dos perfis de RAPD, analisando 36 variáveis em 3 casos, para as linhagens tipificadas. Coeficiente de similaridade estimado por análise *Simple Matching*. O dendrograma representa similaridade de 0,097 entre F5 de *A. flavus* e as linhagens de *A. nidulans*. Já entre as linhagens de *A. nidulans*, a similaridade é de 0,806.

O *fingerprint* de DNA, empregando marcador dominante RAPD, revelou padrão eletroforético da amostra RT2 compatível com a amostra UT448, ou seja, a proximidade genética entre as mesmas indica ser a mesma linhagem, sendo o baixo polimorfismo oriundo de alterações no genoma do fungo. A análise intraespecífica foi alcançada, pois a amostra de *A. flavus* foi alocada distintamente de RT2 e UT448 na análise de agrupamento.

4.2 Purificação da proteína antiinflamatória

Após cultivo da linhagem RT2 e subsequente clarificação do sobrenadante, este foi congelado, liofilizado e amostras foram submetidas a gel filtração em coluna Superdex 75, em sistema FPLC (Figura 8). Em trabalho anterior, diversas frações separadas em gel filtração foram testadas *in vivo*. Neste trabalho, conhecendo a fração que continha a atividade, esta fração foi selecionada, como indicado na Figura 8 e utilizada nas etapas subsequentes de purificação.

Figura 8: Cromatograma da purificação realizada em sistema FPLC, utilizando coluna Superdex 75. Como fase móvel, foi empregado bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,0. A eluição foi realizada de forma isocrática, sendo coletadas frações de 1 mL, com leitura simultânea da absorvância em 280 nm. As setas indicam a região selecionada, contendo atividade antiinflamatória, para as etapas cromatográficas subsequentes.

Figura 9: Cromatografia de exclusão molecular em sistema HPLC, utilizando coluna TSK3000SW. A amostra coletada da gel filtração em Superdex 75 foi liofilizada, ressuspendida em volume apropriado e aplicada ao sistema. Como fase móvel, foi empregado bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,0. A eluição foi realizada de forma isocrática, sendo coletadas frações de 1 mL, com leitura simultânea da absorvância em 280 nm, na região indicada pelas setas.

Figura 10: Re-cromatografia de exclusão molecular em sistema HPLC, utilizando coluna TSK3000SW. A amostra coletada da cromatografia de exclusão molecular em TSK3000SW foi liofilizada, ressuspensa em volume apropriado e aplicada ao sistema. Foi usada como fase móvel, bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,0 e a eluição foi feita de forma isocrática, monitorando-se a absorvância do eluato a 280 nm, coletando-se manualmente a região indicada pelas setas acima.

A fração coletada foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK3000SW em sistema HPLC, onde a região contendo atividade foi novamente identificada e fracionada (Figura 9), entretanto neste momento ainda não foi possível separar todos os contaminantes e uma re-cromatografia da fração coletada foi necessária (Figura 10). Após análise, via SDS-PAGE (dado não mostrado), desta amostra repurificada, foram visualizadas mais de uma banda, sugerindo a necessidade de outro método cromatográfico.

A fração coletada da re-cromatografia de exclusão molecular foi então submetida a uma cromatografia de fase reversa, em que um sistema HPLC foi acoplado uma coluna C18 e aplicado um gradiente linearmente progressivo de 0 a 100% de solvente orgânico, para eluição das proteínas ali adsorvidas. O pico eluído em 17,1min, coletado sem seus contaminantes (Figura 11) é uma das proteínas mais abundantes no cromatograma e além do alto grau de pureza em SDS-PAGE (Figura 12), continha a atividade antiinflamatória descrita.

Figura 11: Cromatografia de fase reversa em sistema HPLC utilizando coluna C18. A amostra coletada na re-cromatografia em TSK3000SW foi liofilizada, ressuspensa em volume apropriado de Tampão A e aplicada ao sistema. A amostra foi eluída a um fluxo de 1 mL/min com Tampão B de 0 a 100% de 5 a 35 min, lida em absorvância de 280 nm e a região indicada pelas setas coletada manualmente.

Figura 12: SDS-PAGE a 12%, sob condições redutoras, da proteína purificada do sobrenadante da cultura da linhagem RT2 de *Aspergillus nidulans*, seguido de coloração por nitrato de prata. Na linha 1, 0,5 µL marcador de peso molecular (KDa) com referidas bandas evidenciadas. Linha 2, contendo 100 µg da proteína purificada.

A purificação foi realizada com sucesso, como revelado por eletroforese. Esta amostra purificada foi utilizada para os testes de inflamação *in vivo*, apresentados a seguir.

4.3 Sequenciamento da proteína purificada via espectrometria de massa

A proteína purificada foi enviada para análise em espectrometria de massa que resultou no sequenciamento de dois fragmentos TLSPDLCSR (Figura 13) e VVTVLSPR (Figura 14). O primeiro peptídeo gerado possui alta confiabilidade na sequência por apresentar um bom sinal de leitura na ionização dos aminoácidos, já o segundo peptídeo gerado, possui leituras mais baixas, porém suficientes para definir uma sequência de oito aminoácidos.

Figura 13: Sequenciamento *De Novo* do peptídeo produzido por tripsinização da proteína purificada e analisado em MS-MS-TOF gerando a sequência TLSPDLDCSR.

Figura 14: Sequenciamento *De Novo* do peptídeo produzido por tripsinização da proteína purificada e analisado em MS-MS-TOF gerando a sequência VVTVLSPR.

4.4 Reconhecimento do gene referente à proteína de estudo no genoma do *Aspergillus nidulans* via Biologia Computacional.

A sequência de dez aminoácidos do peptídeo TLSPDLDCSR, cuja qualidade do sequenciamento foi melhor, como indicado pelo nível de ionização no gráfico, foi confrontada com o banco de dados do genoma do *Aspergillus nidulans* FGSC A4, na

“webpage” http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?organism=fungi, mantida pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Como o peptídeo contém apenas dez aminoácidos, foi necessário o uso de uma matriz menos rígida. Neste caso, utilizamos a matriz PAM70, escolhida após a busca com matrizes mais rígidas não retornarem nenhum resultado.

Esta busca resultou em apenas uma opção de gene, usando como referência a proteína traduzida pelo programa. Entretanto, este resultado mostrou um peptídeo com identidade de 6 em 10 e similaridade de 10 em 10 (Figura 15A), no *contig* 1.115 do cromossomo I. E, quando confrontados os dois peptídeos, contra o mesmo gene, o resultado foi uma identidade de 9 em 18 e uma similaridade de 15 em 18 (Figura 15B).

A Query 1 TLSPDLDCSR 10 TLSP+L+C++ Sbjct 14486 TLSPELECAK 14515	B 1 TLSPDLDCSRVTV-LSPR 18 : : : : : 301 RGGDSMGRFSRTIGVQYTLSPLECAKIVVMYLRTREFYSISVYVCLLIDS 350
---	---

Figura 15: Alinhamento dos peptídeos seqüenciados contra o banco de dados do genoma do *A. nidulans* FGSC A4, via BLAST/NCBI. A) alinhamento do peptídeo TLSPDLDCSR contra o *contig* 1.115 do *A. nidulans*. B) alinhamento dos 18 aminoácidos contra a seqüência gênica específica dentro do *contig*, utilizando o programa Needle/EMBOSS em matriz Blosum 62.

A análise do *contig* 1.115 revelou que a seqüência referente aos peptídeos seqüenciados é, na atual anotação, uma região intergênica. Entretanto, para a mesma região intergênica existe um cDNA descrito (m8h08a1_f1) no banco de dados de EST (*Expressed Sequence Tags*) da Universidade de Oklahoma (EUA).

A seqüência gênica referente à provável proteína de estudo está destacada na Figura 16, em vermelho, com a descrição **AN**. O cDNA anotado para a região também está devidamente demarcado e o local específico codificante para o peptídeo de 10 aminoácidos está demarcado com uma linha azul.

Figura 16: Sequência genômica do cromossomo I do *Aspergillus nidulans* FGSC A4, contig 1.115. A sequência gênica onde o peptídeo foi encontrado está demarcado com **AN** entre 13.577 e 15.607pb; o cDNA anotado para a região está na região entre 13.638 e 14.070pb do contig e; o peptídeo TLSPDLCSR corresponde a região entre 15.578 e 15.607. Imagem gerada pelo Software DNA Star.

A região gênica de interesse não é descrita como um gene, pelo fato de que, quando traduzida nos dois sentidos e respectivos *frames*, está repleta de códons de parada e também por não existirem ESTs anotados no NCBI para região. Entretanto, esta região engloba uma parte do Exon 4 de uma proteína hipotética (AN6922.3) e os Exons de 1 a 4 da proteína transportadora de hexose de alta afinidade, gene *hxtA* (AN6923.3).

4.5 Análise, via espectrometria de massa, da composição de carboidratos na proteína purificada

A análise quantitativa da amostra de proteínas do sobrenadante da linhagem RT2 de *A. nidulans*, realizado durante o trabalho de mestrado (Queiroz *et al.*, 2007), revelou uma alta concentração de carboidratos totais, chegando a 32% de glicosilação do peso total da amostra em estudo.

Entretanto, ainda não se conhecia especificamente o tipo de carboidrato ligado à proteína. Em análise via espectrometria de massa mostrada na Figura 17, foi identificada a presença de N-acetilglicosamina, ligada a uma, duas e três hexoses, mostrando assim diferentes graus de processamento da proteína em estudo, pelas enzimas de adição de hexose.

Figura 17: Análise da composição de carboidratos na proteína purificada via espectrometria de massa em sistema MS-MS-TOF, revelando a presença de N-acetilglicosamina (GlcNAc) ligada a uma, duas ou três hexoses (Hex).

Esta análise mostra um tipo pouco frequente de glicosilação, entretanto ainda não é totalmente conclusiva, sendo necessário futuros estudos para elucidação dos sítios de glicosilação e de sua natureza.

4.6 Efeito antiinflamatório da nandina *in vivo*

4.6.1 Inibição da resposta edematogênica

Os experimentos de edema de pata induzido por carragenina a 1%, mostraram que a Nandina foi capaz de inibir a formação do edema a partir da segunda hora da indução do edema com maior diferença do controle no tempo de três horas.

Para avaliar se o efeito antiinflamatório da Nandina é dependente da ativação do eixo hipófise-hipotálamo-adrenal, foi usado o antagonista do receptor de glicocorticoide RU 38486. O tratamento dos camundongos com RU 38486 (30 mg/kg⁻¹) acarretou o desenvolvimento de um efeito inflamatório significativamente maior do que em animais pré-tratados apenas com etanol ou salina. O co-tratamento dos camundongos com RU 38486, na dose 30 mg/kg⁻¹ i.p. e da Nandina 10 µg /camundongo i.v. reduziu o efeito inflamatório da carragenina (Figura 18).

Figura 18: Inibição do eixo hipófise-hipotálamo via RU38486 na inibição por Nandina do edema de pata em camundongos. Os camundongos foram pré-tratados com RU38486 (50 µL i.p.), uma hora antes da indução do edema de pata por carragenina a 1% (50 µL intra-plantar). A Nandina (100 µL i.v.) foi injetada nos camundongos 15 minutos antes da indução do edema de pata. O volume podal foi medido por Pletismografia, nos tempos relatados e a porcentagem do edema de pata estimado. Os grupos de camundongos continham n = 5 e as análises estatísticas foram realizadas por ANOVA seguido por teste de Tukey, onde * representa a significância em relação ao grupo controle e # representa a significância entre os grupos tratados com Nandina e o grupo tratado com RU38486 (*, # p<0,05; **, p<0,01; ***, ### p<0,001).

4.6.2 Inibição do influxo leucocitário para o peritônio

Estudos preliminares (Tomlinson *et al.*, 1994; Farges *et al.*, 2006) mostraram que a injeção i.p. de carragenina (0,1mL, 1%) induz o influxo de leucócitos totais e de neutrófilos, após 6 horas de sua injeção. Entretanto, nossos estudos preliminares com 1% de λ -carragenina resultaram em uma quantidade exorbitante de células. Portanto, nós utilizamos, neste estudo, a λ -carragenina, na concentração de 0,3%. Em comparação ao controle (número total de leucócitos: $151,6 \pm 9,6 \times 10^5$ células/mL; contendo polimorfonucleares: $145,4 \pm 8,9 \times 10^5$ células/mL e leucócitos mononucleares: $6 \pm 1,48 \times 10^5$ células/mL), o pré-tratamento dos animais (30 min) com a proteína reduziu, quando significativamente o influxo leucocitário (6h) induzido pela carragenina, onde, leucócitos totais apresentam contagem de $57,5 \pm 7,3 \times 10^5$ células/mL, sendo leucócitos polimorfonucleares: $54,8 \pm 2,1 \times 10^5$ células/mL e leucócitos mononucleares: $2,3 \pm 0,7 \times 10^5$ células/mL.

Para avaliar a influência da proteína do *Aspergillus* no influxo leucocitário em período mais tardio da ação da carragenina, a quantidade de leucócitos presentes na cavidade peritoneal foi determinada 96h após a injeção do agente flogístico. Em comparação ao controle (número total de leucócitos: $202,4 \pm 47,8 \times 10^5$ células/mL, contendo leucócitos polimorfonucleares: $17,7 \pm 4,5 \times 10^5$ células/mL e mononucleares: $185,1 \pm 52,3 \times 10^5$ células/mL), o pré-tratamento com a proteína 30 minutos antes e 1 hora após a injeção da carragenina reduziu significativamente o infiltrado celular inflamatório.

A Figura 19 mostra (A) que a carragenina causou um influxo marcante de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais na 6^a hora de sua injeção. Quando a proteína do *Aspergillus* foi injetada trinta minutos antes ou uma hora após a indução da inflamação pela carragenina, o influxo leucocitário diminuiu significativamente, em torno de 37% e 50%, respectivamente; (B) a carragenina causou um influxo leucocitário 1,56 vezes maior do que o observado em 6 horas. Entretanto, ocorreu uma inversão do tipo celular, com predominância de leucócitos mononucleares, como esperado. Quando os animais foram tratados com a proteína do *Aspergillus*, injetada trinta minutos antes ou uma, duas e seis horas após indução de peritonite, pela carragenina, ocorreu uma

diminuição significativa do número de células mononucleares presentes na cavidade peritoneal, na 96^a hora.

Figura 19: Cinética da inibição por Nandina do acúmulo de leucócitos na cavidade peritoneal de camundongos induzido por carragenina. Os grupos de camundongos foram injetados com 0,3% de carragenina na cavidade peritoneal (500 µL). A proteína Nandina foi injetada (10 µg/animal) nos tempos indicados acima, após a injeção de carragenina. A contagem de leucócitos totais, células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) foi determinada no lavado peritoneal coletado em 6 h (A) ou 96h (B) após a injeção de carragenina. Os valores estão apresentados como Média ± Desvio Padrão da média para cada grupo de animais. # p<0,05 e ### p<0,001 quando comparado com o grupo Salina. * p<0,05, **p<0,01 e ***p< 0,001 quando comparado com o grupo Soro Albumina Bovina (SAB).

4.7 Efeitos da Nandina *in vitro*

4.7.1 Citotoxicidade da Nandina em macrófagos residentes isolados

4.7.1.1 Teste de LDH

Os experimentos *in vitro* com macrófagos murinos foram realizados com o intuito de descartar uma eventual citotoxicidade da proteína em estudo sobre células pró-inflamatórias.

Estes experimentos, que avaliam a atividade da enzima lactato desidrogenase, tiveram como controle o cultivo apenas na presença do meio de cultura (RPMI) e de TritonX-100, um detergente que rompe a membrana celular, inviabilizando os macrófagos.

Os resultados estão representados na Figura 20 (8h e 24h), indicando que a Nandina, nas concentrações utilizadas, não é tóxica para os macrófagos. A lactato desidrogenase, na presença de Nandina, manteve sua atividade semelhante ao grupo que recebeu apenas RPMI e é significativamente diferente do grupo tratado com triton.

Figura 20: Viabilidade celular determinada por LDH. A cultura de macrófagos (n=3) foi incubada com triton ou Nandina (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) diluídos em RPMI ou apenas RPMI. As barras representam a concentração de NADH. Os valores estão apresentados como Média $\pm$ Desvio Padrão da média para cada grupo. *** $p < 0.001$ quando comparado ao tratamento com triton.

4.7.1.2 Teste de MTT

Nos experimentos de redução do MTT, macrófagos cultivados em placas de 96 poços foram centrifugados, retirados seus sobrenadantes e adicionados a cada poço MTT diluído em RPMI, com ou sem adição da Nandina (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) ou Triton. A redução do MTT gera formazan e, após as incubações descritas no Item 9.3.2 de Material e Métodos, a densidade ótica foi determinada a 540 nm.

A porcentagem de sobrevivência foi determinada pela média das triplicatas de cada grupo, em relação à média do RPMI (100%). A redução da porcentagem das células viáveis foi determinada utilizando a complementaridade em relação ao controle (100% subtraída a média do grupo), representadas na Figura 21 (8h e 24h). Esta análise de viabilidade, demonstrou que as concentrações de Nandina testadas, não foram citotóxicas para a cultura de macrófagos, nestas condições experimentais.

Figura 21: Porcentagem de viabilidade celular determinada por MTT. A cultura de macrófagos (n=3) foi incubada triton ou Nandina (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g/mL}$) diluídos em RPMI ou apenas RPMI. As barras representam a viabilidade celular medida pela conversão de MTT a formazan em uma reação colorimétrica. Os valores estão apresentados como Média $\pm$ Desvio Padrão da média para cada grupo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ quando comparado ao tratamento com triton.

4.7.2 Efeito da Nandina sobre a produção das ciclooxygenases 1 e 2 por macrófagos residentes, induzida por LPS

As análises de *western blot*, utilizando anticorpos específicos contra COX-2, mostraram que a indução com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de estimular a produção desta enzima, significativamente, quando comparado ao grupo controle.

Nos experimentos de expressão de ciclooxygenases foram usadas as doses de 10, 1, 0,1 e 0,01 $\mu\text{g/mL}$ de Nandina, baseadas no experimento de MTT e LDH, que demonstraram que estas concentrações não são citotóxicas para macrófagos em cultura.

Para a normalização dos dados de densitometria das bandas de COX-2, foi feita a divisão destes valores pelos valores das bandas de β -actina. Depois, estes valores foram novamente normalizados considerando-se o valor da respectiva banda de LPS, normalizada, como 100% e as demais proporcionais a esta. A seguir, os valores percentuais foram normalizados para 2, ou seja, 100% correspondendo a 2 e os outros valores proporcionalmente ajustados. Assim os resultados estão representados na Figura 22.

Figura 22: Normalização da densitometria das bandas de *Western blot* para COX-2. A cultura de macrófago ($n = 4$) foi submetida ao tratamento com Nandina (10, 1, 0,1 e 0,01 $\mu\text{g/mL}$) e/ou LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), a seguir suas proteínas foram submetidas à SDS-PAGE (10%), transferidas para membrana de nitrocelulose e ligadas a anticorpos específicos comerciais para COX-2 e β -actina (destacado na parte superior da figura). As bandas luminescentes registradas em filme foram analisadas por densitometria. O valor da densidade ótica foi normalizado utilizando β -actina e ajustado para os respectivos valores de LPS ($\text{DO} = 2$). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. * representa $p < 0,05$; *** representa $p < 0,001$, em relação a LPS.

Nestas condições experimentais a Nandina foi capaz de inibir significativamente a produção de COX-2 induzida por LPS, quando utilizadas as concentrações de 1, 0,1 e 0,01 µg/mL, adicionadas a cultura 30 minutos antes do estímulo com LPS, no período de 8 horas após este estímulo. Entretanto, a concentração de 10 µg/mL não inibiu a produção de COX-2 estimulada por LPS e quando utilizada sem este estímulo, foi capaz de induzir a produção de COX-2.

Quando a Nandina foi adicionada a cultura, 30 minutos antes do estímulo com LPS e a cultura interrompida 24 horas após este estímulo, nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de inibir a produção de COX-2.

As mesmas membranas de nitrocelulose usadas nos experimentos de COX-2 foram limpas de seus anticorpos (por meio de lavagem, em tampão *stripping* [ANEXO], a 60°C) e submetidas à ligação com anticorpos contra COX-1 e β-actina e respectivos anticorpos secundários para luminescência.

Todos os resultados foram normalizados dividindo-se o valor da densitometria da banda de COX-1 pela da banda de β-actina. Depois, estes valores foram novamente normalizados considerando-se o valor da respectiva banda Controle, normalizada, como 100% e as demais proporcionais a esta. A seguir, os valores percentuais foram normalizados para 2, ou seja, 100% correspondendo a 2 e os outros valores proporcionalmente ajustados. Assim os resultados estão representados na Figura 23.

Nos experimentos de expressão de ciclooxigenases foram usadas as doses de 1, 0,1 e 0,01µg/mL de Nandina, já que a dose de 10µg/mL foi indutora de COX-2, na presença (8h) ou ausência de LPS (8 e 24h). Estes resultados mostraram que Nandina não interfere na produção constitutiva de COX-1, em macrófagos residentes peritoneais, em cultura de 8 ou 24 horas após a indução por LPS.

Figura 23: Normalização da densitometria das bandas de *Western blot* para COX-1. A cultura de macrófago ($n = 4$) foi submetida ao tratamento com Nandina (1, 0,1 e 0,01 µg/mL) e/ou LPS (10 µg/mL), a seguir suas proteínas foram submetidas à SDS-PAGE (10%), transferidas para membrana de nitrocelulose e ligadas a anticorpos específicos comerciais para COX-1 e β-actina (destacado na parte superior da figura). As bandas luminescentes registradas em filme foram analisadas por densitometria. O valor da densidade ótica foi normalizado utilizando β-actina e ajustado para os respectivos valores do Controle (DO = 2). As barras representam a média ± desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos.

4.7.3 Quantificação de prostaglandina E_2 no sobrenadante da cultura de macrófagos

Os sobrenadantes das mesmas culturas de macrófagos utilizados nos experimentos de COX 1 e 2 foram utilizados nos experimentos de quantificação de Prostaglandina E_2 (PGE₂), por meio de Ensaio Imuno Enzimático (EIA).

As amostras de sobrenadante foram diluídas 1:150, aplicadas a placas contendo anticorpos anti-PGE₂ aderidos, incubadas e submetidas à reação colorimétrica, conforme descrito no Item 3.9.4 de Material e Métodos.

Os valores obtidos em pg/mL foram então multiplicados por 150, por causa da diluição inicial e representados na forma de gráfico na Figura 24, em ng/mL.

Estes resultados mostram que a Nandina, nas concentrações de 1, 0,1 e 0,01 µg/mL, não induz a produção de PGE₂, enquanto que a dose de 10 µg/mL induz levemente (não

significante estatisticamente) a produção de PGE_2 , talvez pela indução da expressão de COX-2, como demonstrado acima.

O tratamento com LPS induziu a produção de PGE_2 pelos macrófagos tanto em oito, quanto em vinte e quatro horas e a Nandina não foi capaz de inibir esta produção induzida por LPS.

Fig

ção de PGE_2 no sobrenadante da cultura de macrófagos. O sobrenadante dos macrófagos em cultura ($n=3$), nos tempos de 8 e 24h, foram submetidos à quantificação de PGE_2 por EIA. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada em ANOVA seguida de teste Tukey. * representa $p < 0,05$; ** representa $p < 0,01$.

5 DISCUSSÃO

Em 1996, Zucchi e colaboradores desenvolveram a linhagem RT2 de *Aspergillus nidulans*, com habilidade de produzir um fator antiinflamatório. Ao comparar esta linhagem com a linhagem parental UT448, estes autores observaram que a nova linhagem possuía características fenotípicas bastante distintas da parental, além de produzir um novo fator, de natureza bioquímica desconhecida. Em nosso estudo prévio, este fator foi parcialmente purificado e identificado, como sendo de natureza protéica (Queiroz *et al.*, 2007). No presente trabalho, analisamos a alteração gênica sofrida pela linhagem RT2, após o tratamento com RNA, refinamos a purificação da proteína e realizamos a sua caracterização, de forma mais detalhada, do ponto de vista bioquímico e atividade antiinflamatória.

A alteração genômica, identificada nos polimorfismos visualizados pela técnica de RAPD, que diferencia genomicamente as duas linhagens, nos levou à confirmação de que as diferenças fenotípicas observadas entre as linhagens (ver Resultados: Tabela 2) ocorreram em nível de DNA. Isto nos remete a duas possibilidades quanto à mudança do DNA: a primeira é o rearranjo gênico, em que o estresse produzido pela entrada de material genético exógeno tenha levado a trocas de posições intercromossomais, que pode, ou não, ter sido mediada por retrotransposons; a segunda, e a mais provável, a recombinação homóloga em que, após a conversão a cDNA, por uma transcriptase reversa, seqüências homólogas tenham se recombinado por duplo *crossing-over* e modificado regiões gênicas. Ambos os casos poderiam levar à reativação de genes, antes silenciados, ou a mutações pontuais, com alteração dos transcritos celulares.

Em relação à primeira hipótese, elementos genéticos móveis, presentes no genoma de muitos organismos, contribuem para a variabilidade genética, ao favorecerem eventos recombinatórios. Durante o curso da evolução, alguns elementos são assimilados ao genoma, contribuindo atualmente para a sua organização (Smit, 1999).

Em *Aspergillus nidulans*, “mobile *Aspergillus* transformation enhancers” (MATE) foram descobertos durante a investigação do plasmídio autorreplicante ARp1 (Aleksenko e Clutterbuck, 1997). A seqüência AMA1, responsável pela replicação do

plasmídio, é um inserto genômico, derivado do segmento do cromossomo IV, contendo elementos MATE. Evidências de elementos similares foram encontradas em outras linhagens e estão presentes em grande número e posições em cultura de linhagens selvagens de *A. nidulans*, levando à conclusão de que MATE são ou foram elementos transponíveis (Aleksenko e Clutterbuck, 1997). Entretanto, pouco ainda é conhecido sobre o modo de transposição.

Em 2001, Nielsen e colaboradores descreveram duas famílias de repetições longamente dispersas dentro do cromossomo IV de *A. nidulans*, denominadas *Dane1* e *Dane2* (Degenerated *Aspergillus nidulans* elements), com alta similaridade aos retrotransposons MAGGY (Farman *et al.*, 1996). Eles verificaram também que estes elementos foram ativamente duplicados e que estes elementos móveis podem se propagar por duplicação.

Como o material genético, inserido nos protoplastos da linhagem UT448, proveio de ratos, que possuem abundância de elementos transponíveis LINEs e SINEs (Yang *et al.*, 2004), além da capacidade do próprio *A. nidulans* para transferência gênica, a possibilidade de ter ocorrido transposição ou retrotransposição não está descartada. Entretanto, a mesma necessita de investigação do gene na linhagem RT2 e das seqüências flanqueadoras para o teste da hipótese.

Por outro lado, a relação genética entre RNAi (RNA de interferência) e o controle de elementos transponíveis, foi inicialmente estabelecida seguindo a varredura mutagênica provocada por EMS (etano metil sulfonato) em *Caenorhabditis elegans*. Muitos mutantes de *C. elegans* são deficientes em RNAi e também apresentam aumento na atividade de DNA transposons, como demonstrado por análise via *Southern blotting* (Tabara, 1999, Ketting *et al.*, 1999). Outras pesquisas em *C. elegans* demonstraram que nem todos os genes de RNAi são necessários para o silenciamento de transposons e que existe uma importante interação entre as duas vias regulatórias (Vastenhouw, 2003). Evidências adicionais, que estão sendo demonstradas em análises genéticas, em vários outros eucariotos, dão suporte à função do RNAi no silenciamento de transposons e retrotransposons.

A tecnologia de RNAi foi utilizada com sucesso em *A. nidulans* e em *A. fumigatus*, mas somente silenciando um ou dois genes dentro de cada vetor (Hammond e Keller, 2005; Mouyna *et al.*, 2004). Tsitsigiannis e colaboradores (2005) também

demonstraram o silenciamento de três genes específicos em *A. fumigatus*, mostrando a atuação destes mecanismos na família dos fungos filamentosos *Aspergillus*.

Em relação à segunda hipótese, há pelo menos duas vias independentes, que evoluíram para reparar rupturas da dupla fita (DSBs): recombinação homóloga (HR) e junção final não homóloga do DNA (NHEJ) (Chu, 1997). A HR tem significado importante no reparo do DNA, em fungos filamentosos e leveduras (Chu, 1997). No genoma dos *A. nidulans*, foram identificados dois genes que codificam as proteínas relacionadas a Rad51 (uvsC e possivelmente uvsE) de *S. cerevisiae* e a *RecA* de *E. coli*. O complexo do gene *Mre11* é requerido para a HR. Um destes componentes, *Nbs1* (*ScaA*) e *Rad51* é encontrado em *A. nidulans*, no qual a identificação do gene foi executada pela transformação mediada por DNA ou por mutantes sensíveis à camptotecina (van Heemst *et al.*, 1997; Bruschi *et al.*, 2001).

A recombinação homóloga em células eucarióticas, provavelmente, envolve as enzimas *branch migration* e resolvases que são análogas funcionais ao sistema bacteriano *RuvABC* (Wood *et al.*, 2001). Um homólogo da nuclease *Mus81* que foi ligado à definição da junção de Holliday foi encontrado em *A. nidulans*. Um homólogo do gene *MGS1*, que codifica uma proteína elongadora AAA (+), que pertence à classe das ATPases e cuja a região central é similar a *RuvB* de *E. coli* (Hishida *et al.*, 2001), foi observada em *A. nidulans*.

Em mamíferos, a maioria do reparo de DSBs é realizado por NHEJ, ao invés de recombinação homóloga (Eisen e Hanawalt, 1999). Os estudos genéticos mostraram que quatro proteínas (XRCC4-7) são requeridas pelo menos especificamente, para NHEJ nos seres humanos. Três destas XRCC5-7, cooperam para compor o complexo proteína cinase, dependente de DNA composto de *Ku80/86* (XRCC5), de *Ku70* (XRCC6), e de DNA-PKCs (XRCC7). Supõe-se que este complexo funciona unindo as extremidades do DNA e à atividade estimulada da DNA ligase (Eisen e Hanawalt, 1999; Wood *et al.*, 2001). Como encontrado em levedura, os homólogos putativos de *Ku70* e *Ku86* foram identificados em *A. nidulans*. Embora (*PRKDC*) o homólogo XRCC7 não fosse encontrado no genoma do *A. nidulans*, *LIG4*, que é responsável pela ligação dos fragmentos do DNA foi observado. O complexo *Mre11* também está envolvido na NHEJ em seres humanos e em levedura, assim como em HR (Paull e Gellert, 1998).

Como o *A. nidulans* possui maquinaria genética para a realização tanto de recombinação homóloga, quanto de junção final não homóloga do DNA, a possibilidade dos fragmentos do material genético do *Rattus norvegicus* inserirem-se e interferirem no genoma do fungo é bastante alta. Novamente, se faz necessário o sequenciamento de região específica do DNA do *A. nidulans* e sua subsequente comparação com o genoma do *R. norvegicus*, para a elucidação dos eventos ocorridos no processo.

Como demonstrado acima, vários mecanismos genéticos de regulação da expressão gênica são intercomunicáveis e poderiam participar das alterações genotípicas e fenotípicas encontradas na linhagem RT2, após a inserção do RNA total de macrófagos de ratos. Entretanto, não é possível propor um mecanismo atuante no evento, pelo fato de que nenhum deles ter sido induzido *a priori*, permanecendo então, a elucidação desta pergunta adiada para pesquisas futuras.

A busca, via BLAST, no genoma do *A. nidulans* pelos peptídeos seqüenciados por meio de espectrometria de massa apontou para uma região anotada como intergênica na linhagem FGSC A4. Entretanto, dados da literatura e dos bancos de dados suportam nossa teoria, de que esta é uma provável região onde o gene, codificante da proteína em estudo, está localizado.

O estudo de regiões intergênicas divergentes no *A. nidulans* (Punt *et al.*, 1995) no cromossomo VIII, mostrou que, assim como a seqüência aqui analisada, a região intergênica possui 1.200 pb e que nesta região, considerada intergênica, possui o gene *NirA* codificante de uma proteína homóloga a duas permeases. Foi concluído, então, que *A. nidulans* possui organização especial divergente e multiplicidade de transcrição envolvidos na regulação transcricional. Ainda o fato da seqüência gênica, referente aos peptídeos seqüenciados estar em uma região anotada como intergênica, não invalida a análise computacional realizada para a identificação da proteína de estudo.

A presença de um cDNA anotado (m8h08a1_f1) na mesma região, corrobora a teoria de que a linhagem RT2 possui uma seqüência e/ou uma expressão gênica diferenciada, da linhagem escolhida (FGSC A4), para o sequenciamento do *Aspergillus nidulans*.

As divergências polimórficas no DNA, identificada por RAPD, podem exemplificar alterações sofridas na linhagem RT2, pelo tratamento com RNA exógeno, que podem ter alterado pontualmente os códons de iniciação e os códons de parada,

anotados no genoma da linhagem FGSC A4, levando à uma transcrição do gene, antes silenciado na linhagem UT448.

Independentemente de quais mecanismos genéticos atuaram no genoma do fungo, o mesmo passou a produzir uma proteína que a linhagem parental UT448 não produzia. A identificação desta proteína começou por sua purificação, por meio de métodos cromatográficos, escolhidos após testes sucessivos.

Atualmente, a purificação da proteína de interesse é realizada em três etapas. A primeira é a gel filtração em coluna Superdex 75, que facilitou a remoção de debris provenientes da cultura. O refinamento da purificação foi realizado por cromatografia de exclusão molecular, em TSK 3000, em sistema de HPLC, seguida pela cromatografia de fase reversa, em coluna C18, no mesmo sistema. Também foram testadas trocas aniônica e catiônica, além de afinidade por açúcares em concanavalina A. Entretanto, a alta taxa de glicosilação desta proteína, na ordem de 32% (Queiroz *et al.*, 2007), dificultou a adsorção da proteína nestes tipos de resina cromatográfica.

A purificação de proteínas heterólogas, produzidas por *Aspergillus niger*, foi descrita anteriormente, como o exemplo da produção heteróloga de lisozima, a partir de gel filtração em coluna Sephachryl HR100, seguida de troca iônica em SP Sepharose Big Beads, pelo meio da qual obteve-se alto rendimento e atividade específica (Spencer *et al.*, 1999). Record e colaboradores (1995), realizaram a purificação de proteína do *Aspergillus oryzae*, por meio de gel filtração em coluna Sephadex G-75, DEAE-Sepharose e troca iônica em coluna Mono Q. Neste caso, foi obtido aumento da atividade específica, mas baixo rendimento, pela utilização da coluna Mono Q. Em contraste, obteve-se um alto rendimento, mas com uma baixa atividade específica quando a gel filtração foi utilizada.

Estes exemplos revelam que a escolha do método para a purificação é importante e depende do objetivo para o qual a proteína será empregada. Em muitos estudos, a gel filtração é utilizada como um método inicial de purificação, seguido de refinamento, a ser escolhido de acordo com características bioquímicas da proteína de interesse e parece ser um bom modelo, desde que promova uma separação total de proteínas, como demonstrado no presente estudo.

A taxa de glicosilação de nossa proteína de estudo, a Nandina, (~32%) (Queiroz *et al.*, 2007) é considerada bastante alta. Exemplos similares foram

encontrados em fungos do mesmo gênero. De modo semelhante, Panchal e Wodzinski (1998) encontraram 35,29% de N-glicosilação em uma fitase, produzida por *Aspergillus niger*. Apesar de um dos tipos de glicosilação na Nandina ter sido caracterizado como N-acetilglicosamina – um carboidrato comumente encontrado em *A. nidulans*, principalmente na formação da quitina (Borgia, 1992; Borgia e Dodge, 1992; Alfonso *et al.*, 1995; Borgia *et al.*, 1996; Guest *et al.*, 2004) – que na Nandina está ligada a uma, duas ou três hexoses, o tipo de ligação dos carboidratos (N ou O-ligação) à proteína ainda necessita de esclarecimento.

A ligação mais provável de carboidratos no *Aspergillus* parece ser a O-glicosilação, pois, como demonstrado por Perlinska-Lenart e colaboradores (2005), a exportação de proteínas para o sobrenadante depende deste tipo de modificação pós-traducional. Carboidratos O-ligados a proteínas de *Aspergillus nidulans*, são uma forma comum de glicosilação, atribuída, algumas vezes, à ação da enzima O-manosiltransferase (Shaw e Momany, 2002; Oka *et al.*, 2004).

Por outro lado, a forma mais comum de ligação de carboidratos a proteínas é a N-glicosilação, como no caso da pectato liase S de *A. niger* (Benen *et al.*, 2000), em que duas formas, N-glicosilada e não glicosilada foram encontradas. No entanto, em ambos os casos essa enzima apresentou atividade similar. Ainda, Sorensen e colaboradores (2003) observaram que oligossacarídeos deste fungo estavam ancorados a resíduos de asparagina. Porém, Walmsley e Hooper (2003) ao estudarem o efeito de N-glicosidases, identificaram que seu sítio de ligação é formado por Asn-Ile/Phe-Thr.

Em função dos dados anteriores (Queiroz *et al.*, 2007), a atividade antiinflamatória da glicoproteína, pré-purificada e isolada, foi testada em um modelo experimental de edema podal de camundongos, o presente estudo tentou desvendar o mecanismo pelo qual a Nandina inibe os eventos inflamatórios.

Neste estudo, foram utilizados modelos experimentais, induzidos pelo mucopolissacarídeo carragenina, que permitem avaliar eventos cruciais do processo inflamatório, que são a formação de edema e o influxo leucocitário para o local da injúria. O teste de edema de pata induzido por carragenina, é o modelo experimental classicamente utilizado para o *screening* da atividade antiinflamatória de extratos e compostos isolados (Nakamura e Shimizu, 1974; Oyanagui e Sato, 1991; Sakaguchi *et al.*, 2006).

A potente atividade antiinflamatória da proteína isolada no presente estudo demonstra que a glicoproteína isolada possui efeito específico no tratamento de animais, sendo que, uma concentração equivalente de albumina bovina, não apresentou atividade antiinflamatória no mesmo modelo experimental. O decréscimo do edema de pata induzido por carragenina, causado pela proteína isolada do *A. nidulans*, ocorreu no ápice do edema, poderia ser dependente da inibição de prostaglandinas (Holsapple *et al.*, 1980). Esse efeito antiinflamatório foi similar aos obtidos com outras substâncias, oriundas de produtos naturais, como o extrato de folhas de *Pongamia pinnata* (Srinivasan *et al.*, 2001) e ReN1869 (Olsen *et al.*, 2002), utilizando o mesmo modelo experimental de edema, que é utilizado classicamente.

Uma vez que a fração purificada do *A. nidulans* apresentou atividade antiinflamatória em estudos anteriores de nosso laboratório (Queiroz *et al.*, 2007), neste trabalho investigamos o potencial efeito antiinflamatório da proteína do *Aspergillus*, em modelo de inflamação aguda, induzida por carragenina. A injeção subplantar da solução de carragenina induz edema inflamatório com um pico máximo em três horas que é desencadeado pela presença de prostaglandinas (Posadas *et al.*, 2004). O estudo do influxo leucocitário, em peritonite induzida por carragenina em camundongos, é utilizado como um modelo adequado para investigação da ação de agentes antiinflamatórios sobre leucócitos infiltrados, durante o processo inflamatório (Chadzinska *et al.*, 2001), em conjunto com os dados do edema de pata, no qual a indução por carragenina envolve migração leucocitária, representam os eventos celulares envolvidos neste processo.

Os resultados mostraram, nos experimentos de inibição do edema, ação antiinflamatória, de acordo com o protocolo original e indica que a glicoproteína interfere com os eventos exudativos da inflamação, inibindo-os.

Além de regulado positivamente por diferentes mediadores inflamatórios, o processo inflamatório é negativamente regulado por glicocorticóides endógenos liberados pela ativação do eixo hipófise-hipotálamo-adrenal. A corticosterona é a substância antiinflamatória mais potente que se conhece. Na vigência de um estímulo lesivo de qualquer natureza este sistema é ativado para controlar a evolução da reação inflamatória consequente (Katzung, 2006).

De posse destas informações, avaliamos se o efeito antiinflamatório da Nandina estaria relacionado à atividade deste eixo e à liberação de antiinflamatórios endógenos.

Nós realizamos experimentos utilizando um antagonista do receptor de glicocorticóide, bem caracterizado, RU38486. Nós hipotetizamos que, se a interação da proteína de *Aspergillus* não estiver ao nível do receptor de glicocorticoide (GR), RU38486 não iria interferir na ação antiinflamatória da proteína do *Aspergillus*. RU38486 aumentou o efeito inflamatório da carragenina, como demonstrado anteriormente (Laue *et al.*, 1988).

A Nandina diminuiu o edema de pata mesmo quando o inibidor de dos receptores de glicocorticóides foi administrado, sugerindo que esta proteína exerce a atividade antiinflamatória independente do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e portanto, do aumento da produção de glicocorticóides endógenos (Garcia Leme e Schapoval, 1975; Khaksari *et al.*, 2007).

Além da formação do edema, a reação inflamatória é caracterizada pelo acúmulo de leucócitos no local da injúria (Sedgwick *et al.*, 1985). Desse modo, no presente trabalho, avaliamos o efeito da glicoproteína no influxo leucocitário induzido pela carragenina na cavidade peritoneal de camundongos. A migração de leucócitos para o local da injúria é um evento central da inflamação, pois estas células têm a função de fagocitar os agentes lesivos e produzir substâncias microbidas para sua eliminação. Os resultados mostraram que a injeção (intra venosa) prévia da proteína do *Aspergillus* promoveu uma alta redução (~63%) do influxo leucocitário infiltrado, na cavidade peritoneal dos animais, reforçando a hipótese da que a Nandina promove efeito antiinflamatório importante, ao reduzir os níveis tanto de leucócitos polimorfonucleares, quanto de mononucleares, nos tempos de 6 e 96 horas, respectivamente.

O processo de migração leucocitária dos vasos sanguíneos para os tecidos, depende da expressão sequencial de várias moléculas de adesão na membrana plasmática de leucócitos e de células endoteliais. O influxo de leucócitos para os tecidos é um indicador da resposta inflamatória aguda. Esta reação local é regulada e mantida por muitos mediadores proinflamatórios solúveis, como as citocinas, metabólitos derivados de lipoxigenase, ciclooxigenase e fatores derivados do soro (Loram *et al.*,

2007). Além de mediadores lipídicos, a carragenina promove a geração de óxido nítrico (NO), aumenta a atividade da adenosina deaminase (ADA) e da mieloperoxidase (MPO) em leucócitos (Regnault *et al.*, 1996; Frode e Medeiros, 2001). Deste modo, a redução do edema, induzido por carragenina, pela Nandina, reflete a influência desta glicoproteína nos eventos celulares da inflamação.

Esta é a primeira substância purificada e bioquimicamente caracterizada, proveniente de cultura de fungo, com atividade antiinflamatória. A atividade antibiótica e antiparasitária originárias de produto de cultura de fungos já foi determinada anteriormente por vários autores (Balyan *et al.*, 1988; Jiao *et al.*, 2004; Fox, 2006; de la Torre e Reboli, 2007).

A reação inflamatória é determinada pela ação seqüencial de diferentes mediadores liberados ou produzidos no decorrer do processo. Desde que a Nandina inibe a formação de edema induzido por carragenina em fase dependente de prostaglandina (Yuhki *et al.*, 2004), sugere-se que esta glicoproteína exerça algum efeito nas vias de síntese de prostaglandinas, potentes indutores inflamatórios. A importância destes indutores na inflamação pode ser testado pelo largo uso terapêutico de compostos antiinflamatórios não esteroidais, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de prostaglandinas, a partir da inibição das enzimas ciclooxigenases (Curry *et al.*, 2005).

A necessidade de avaliar a influência da Nandina, sobre a produção de prostaglandinas, requereu experimentos *in vitro*, utilizando macrófagos residentes coletados da cavidade peritoneal de camundongos. Verificamos que, a Nandina não foi citotóxica nas concentrações de 0,1, 1 e 10 µg/mL. Nos experimentos *in vivo* foi utilizada a dose de 10 µg/animal e, por este motivo, foi escolhida como a concentração mais alta nos experimentos de MTT e LDH. Os dados de citotoxicidade *in vitro* somados aos resultados *in vivo* demonstram que o efeito desta glicoproteína ocorre por mecanismo específico e não por efeito citotóxico. A ausência de citotoxicidade da Nandina sobre macrófagos, nas doses utilizadas, possibilitou o desenvolvimento dos estudos *in vitro*.

Em adição, o fato da Nandina não ser citotóxica para macrófagos em cultura, em concentrações tão altas quanto 10 µg/mL, reforça seu potencial para o desenvolvimento de uma nova molécula com ação antiinflamatória.

Fundamentados no conhecimento de que carragenina induz a produção de prostaglandina, avaliamos o efeito da Nandina sobre a produção de COXs, induzidas pelo LPS.

As ciclooxigenases são enzimas que catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanas, potentes mediadores inflamatórios lipídicos. A ativação catalítica de COX-1 e COX-2 está relacionada aos níveis de ácido araquidônico liberado no citoplasma das células (Murakami *et al.*, 2000). A COX-1 é a forma amplamente distribuída nos tecidos de mamíferos e constitutivamente expressa; a COX-2 é uma enzima induzível que é proeminente no local da inflamação embora também seja expressa constitutivamente em alguns tecidos, como rins e cérebro (Kis *et al.*, 2004; Kis *et al.*, 2006).

Estudos mostraram que LPS de *E. coli* induz a expressão da COX-2, em cultura de macrófagos murinos (Yamada *et al.*, 1997; Yamashita *et al.*, 1997), a partir de receptor celular próprio CD14 (Yang *et al.*, 1999). Alguns dos inibidores de COX-2 atuam diretamente na transcrição gênica, o que pode ser observado por meio de *western blot*, enquanto que outros atuam em sua atividade enzimática, investigado pela diferença nos níveis de prostaglandinas (Yamada *et al.*, 1997; Bezugla *et al.*, 2006). Este modelo tem sido utilizado atualmente como padrão para a indução de COX-2 (Candelario-Jalil *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2007; Scott e Owens, 2008).

Apesar de não ser citotóxica, a dose de 10 µg/mL de Nandina induziu a expressão de COX-2 na cultura de macrófagos residentes, em 8 horas, na presença ou ausência de LPS. Tanto que, a mesma dose não foi novamente utilizada nos experimentos subsequentes (COX-2 em 24 horas e COX-1). Entretanto, neste modelo experimental, as concentrações de 1, 0,1 e 0,01 µg/mL de Nandina foram capazes de inibir a produção de COX-2. E, quando incubadas na ausência de LPS, a produção de COX-2 foi similar ao grupo controle.

Nos experimentos em que a produção de COX-2 foi investigada vinte e quatro horas após a indução, ou não, dos macrófagos com LPS, nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de reduzir a produção de COX-2, obtendo médias similares ao grupo em que os macrófagos foram tratados apenas com LPS.

Os níveis de produção de COX-1 não foram afetados pelos tratamentos com Nandina em quaisquer doses utilizadas, tanto em oito quanto em vinte e quatro horas.

Este fato caracteriza a Nandina como um inibidor seletivo de COX-2. A seletividade para a inibição da expressão e atividade de COX-2 é comum aos Agentes Antiinflamatórios Não Esteroidais (AINEs), que inibem a inflamação *in vivo* (Grosser, 2006).

Portanto, os resultados deste estudo quanto ao mecanismo de ação antiinflamatória da Nandina, até mesmo na concentração de 0,01 µg/mL (10ng/mL), são extremamente relevantes e promissores do ponto de vista de desenvolvimento de um novo antiinflamatório, necessitando estudos pré-clínicos mais detalhados.

Verificamos que a Nandina reduziu a produção de COX-2, sem interferir com a expressão constitutiva de COX-1. Este resultado indica que este é um mecanismo importante para a ação antiinflamatória da Nandina. A inibição não seletiva (inibição de COX-1 e COX-2) causa efeitos colaterais no estômago (Brooks e Day, 1991) e rins (Black, 1986). A inibição seletiva de COX-2, pela Nandina, adiciona importância aos nossos resultados.

Para investigarmos a atividades das COXs na presença de Nandina, determinamos a produção de PGE₂. As prostaglandinas desempenham funções importantes na inflamação e hiperalgesia (Portanova *et al.*, 1996). A produção de PGE₂ ocorre pela conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas intermediárias (PGG₂ e PGH₂), seguida pela ação de PGE-sintases (Tanikawa *et al.*, 2002). Dados da literatura mostram que a produção de PGE₂ sob estímulo de LPS ocorre várias horas após este estímulo (Ambs *et al.*, 1995).

Nossos resultados mostraram que, apesar da redução de COX-2, pela ação da Nandina e da manutenção dos níveis de COX-1, a produção de PGE₂ foi, significativamente, aumentada, em relação ao grupo Controle (RPMI). Estes níveis estavam aumentados apenas nos grupos incubados com LPS. Nos grupos tratados apenas com Nandina, os níveis de PGE₂ não foram diferentes do controle. Mesmo quando Nandina foi utilizada na concentração de 10 µg/mL, dose esta que induziu a expressão de COX-2, os níveis de PGE₂ foram mais altos, mas não estatisticamente diferentes do controle (ver Figura 22).

Resultados semelhantes foram observados em experimentos com Auranofin, demonstrando ação contraditória de um fármaco sobre a produção de COX-2 e PGE₂ (Yamashita *et al.*, 1997). Este fármaco inibiu a produção de COX-2 induzida por 12-O-

tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA), Tapsigargina e A23187, sem alteração dos níveis da produção de COX-1, enquanto que aumenta a produção de PGE₂ pelo aumento da produção do ácido araquidônico. No presente estudo é possível sugerir que a Nandina exerce somente efeitos sobre a expressão protéica da isoforma COX-2 e não sobre a COX-1, uma vez que LPS aumenta a atividade catalítica de COX-1 (Bezugla *et al.*, 2006), supõe-se que esta isoforma seja a responsável pelos altos níveis de PGE₂ que não é afetado pela Nandina.

Em conjunto, nossos dados mostram, pela primeira vez, a ação antiinflamatória *in vivo* de uma proteína do sobrenadante da cultura de *Aspergillus nidulans*. Esta proteína inibe o influxo de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares desde que administrada no início do processo inflamatório. Mais importante, a ação antiinflamatória da Nandina não pode ser neutralizada pela co-administração de RU38486, mostrando que esta proteína age como um agente antiinflamatório real e não por induzir a liberação de glicocorticóides endógenos. Os experimentos *in vitro* mostraram que a Nandina inibe seletivamente a produção de COX-2, como principal mecanismo de ação.

A propriedade antiinflamatória, da proteína isolada da linhagem de *Aspergillus nidulans*, tratada com RNA, aqui investigada, poderia explicar porque *Aspergillus*, nas suas diversas formas invasivas, não induz resposta inflamatória em mamíferos, nem em humanos, especificamente (Antachopoulos e Roilides, 2005) e indica um dos mecanismos, que confere a este gênero, sua alta capacidade invasiva.

6 CONCLUSÕES

As análises genotípicas, fenotípicas da linhagem RT2 de *Aspergillus nidulans* e da atividade de sua glicoproteína antiinflamatória *in vivo* e *in vitro*, nos levaram as seguintes conclusões:

- ✓ A linhagem RT2 proveio da linhagem UT448 de *Aspergillus nidulans*.
- ✓ A introdução de RNA exógeno na linhagem UT448 levou a modificações em nível do genoma do fungo produzindo uma nova linhagem, a linhagem RT2, com coloração dos conídios verde e sem os requerimentos nutricionais da linhagem UT448.
- ✓ Os três passos cromatográficos foram eficientes na purificação da glicoproteína de interesse e permitiram a manutenção de sua atividade antiinflamatória.
- ✓ Esta glicoproteína possui ~40KDa e diferentes graus de glicosilação dependendo do grau de processamento pós traducional sofrido.
- ✓ Apesar de ainda não ser conhecido o tipo de ligação dos carboidratos à proteína, estes possuem uma âncora de N-acetilglicosamina ligada a uma, duas ou três hexoses.
- ✓ A atividade antiinflamatória da glicoproteína produzida pela RT2 (Nandina) não ocorre via eixo hipófise-hipotálamo-adrenal, ou seja, não atua via liberação de glicocorticoides endógenos.
- ✓ A Nandina possui atividade antiinflamatória *in vivo* em dois diferentes modelos de inflamação induzidos por carragenina.
- ✓ A Nandina inibe *in vitro* a produção de COX-2, em cultura primária de macrófagos estimulados com LPS, mas não inibe a produção de COX-1.
- ✓ Apesar de inibir a produção de COX-2 após 8 horas do estímulo com LPS, a Nandina não inibiu a produção de PGE₂.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62(1):35-54.
- Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu Rev Immunol. 1999; 17:593-623.
- Aleksenko A, Clutterbuck AJ. Autonomous plasmid replication in *Aspergillus nidulans*: AMA1 and MATE elements. Fungal Genet Biol. 1997; 21(3):373-87. Review.
- Alfonso C, Nuero OM, Santamaria F, Reyes F. Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. Curr Microbiol. 1999; 30(1):49-54.
- Ambs P, Baccarini M, Fitzke E, Dieter P. Role of cytosolic phospholipase A₂ in arachidonic acid release of rat-liver macrophages: regulation by Ca²⁺ and phosphorylation. Biochem J. 1995; 311(1):189-95.
- Anderson JB, Sirjusingh C, Ricker N. Haploidy, diploidy and evolution of antifungal drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 2004; 168(4):1915-23.
- Andrade AC, Van Nistelrooy JG, Peery RB, Skatrud PL, De Waard MA. The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production. Mol Gen Genet. 2000; 263(6):966-77.
- Antachopoulos C, Roilides E. Cytokines and fungal infections. Br J Haematol. 2005; 129(5):583-96. Review.
- Bahn YS, Xue C, Idnurm A, Rutherford JC, Heitman J, Cardenas ME. Sensing the environment: lessons from fungi. Nat Rev Microbiol. 2007; 5(1):57-69.
- Balyan FR, Taibah A, De Donato G, Aslan A, Falcioni M, Russo A, Sanna M. Titration streptomycin therapy in Meniere's disease: long-term results. Otolaryngol Head Neck Surg. 1998; 118(2):261-6.
- Baptista F, Machado MF, Castro-Prado MA. Alternative reproduction pathway in *Aspergillus nidulans*. Folia Microbiol (Praha). 2003; 48(5):597-604.
- Bartek J, Lukas J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. Curr Opin Cell Biol. 2007; 19(2):238-45.
- Becker TC, de Castro-Prado MA. Parasexuality in asexual development mutants of *Aspergillus nidulans*. Biol Res. 2006; 39(2):297-305.
- Benen JA, Kester HC, Parenicova L, Visser J. Characterization of *Aspergillus niger* pectate lyase A. Biochemistry. 2000; 39(50):15563-9.

INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL JOURNAL EDITORS.
Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal:
sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2006 Jun. 30].
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of journals indexed in Index
Medicus., 2006.
Available from:
www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/browser.cgi
www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html

- Benoit I, Asther M, Sulzenbacher G, Record E, Marmuse L, Parsiegla G, Gimbert I, Asther M, Bignon C. Respective importance of protein folding and glycosylation in the thermal stability of recombinant feruloyl esterase A. *FEBS Lett.* 2006; 580(25):5815-21.
- Bezugla Y, Kolada A, Kamionka S, Bernard B, Scheibe R, Dieter P. COX-1 and COX-2 contribute differentially to the LPS-induced release of PGE₂ and TxA₂ in liver macrophages. *Prostaglandin & Other Lipid Mediators.* 2006; 79:93-100.
- Black HE. Renal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Toxicol Pathol.* 1986; 14(1):83-90.
- Borgia PT, Dodge CL. Characterization of *Aspergillus nidulans* mutants deficient in cell wall chitin or glucan. *J Bacteriol.* 1992; 174(2):377-83.
- Borgia PT, Miao Y, Dodge CL. The *orlA* gene from *Aspergillus nidulans* encodes a trehalose-6-phosphate phosphatase necessary for normal growth and chitin synthesis at elevated temperatures. *Mol Microbiol.* 1996; 20(6):1287-96.
- Borgia PT. Roles of the *orlA*, *tsE*, and *bimG* genes of *Aspergillus nidulans* in chitin synthesis. *J Bacteriol.* 1992; 174(2):384-9.
- Botting RM, Ayob SS. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostagl Leuk Essential Fatty Acids.* 2005; 72:85-87.
- Botting RM. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol.* 2006; 5:113-24.
- Boulton SJ, Jackson SP. *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J.* 1996; 15(18):5093-103.
- Brieland JK, Jackson C, Menzel F, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Halpern J, *et al.* Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 2001; 69(3):1554-60.
- Brookman JL, Denning DW. Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*. *Curr Opin Microbiol.* 2000; 3(5):468-74.
- Brooks PM, Day RO. Nonsteroidal antiinflammatory drugs--differences and similarities. *N Engl J Med.* 1991; 324(24):1716-25. Review.
- Bruschi GC, de Souza CC, Fagundes MR, Dani MA, Goldman MH, Morris NR, Liu L, Goldman GH. Sensitivity to camptothecin in *Aspergillus nidulans* identifies a novel gene, *scaA+*, related to the cellular DNA damage response. *Mol Genet Genomics.* 2001; 265(2):264-75.
- Bucci M, Roviezzo F, Cicala C, Sessa WC, Cirino G. Geldanamycin, an inhibitor of heat shock protein 90 (Hsp90) mediated signal transduction has anti-inflammatory effects and interacts with glucocorticoid receptor *in vivo*. *Br J Pharmacol.* 2000; 131(1):13-6.
- Budman J, Chu G. Processing of DNA for nonhomologous end-joining by cell-free extract. *EMBO J.* 2005; 24(4):849-60.
- Burma S, Chen BP, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst).* 2006; 5(9-10):1042-8. Review.

- Candelario-Jalil E, Pinheiro de Oliveira AC, Graf S, Bhatia HS, Hull M, Munoz E, Fiebich BL. Resveratrol potently reduces prostaglandin E2 production and free radical formation in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia. *J Neuroinflammation*. 2007; 4(1):25.
- Chadzinska M, Maj M, Scislowska-Czarnecka A, Przewlocka B, Plytycz B. Expression of proenkephalin (PENK) mRNA in inflammatory leukocytes during experimental peritonitis in Swiss mice. *Pol J Pharmacol*. 2000; 53(6):715-8.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(21):13926-31.
- Chien HC, Lin LL, Chao SH, Chen CC, Wang WC, Shaw CY, Tsai YC, Hu HY, Hsu WH. Purification, characterization, and genetic analysis of a leucine aminopeptidase from *Aspergillus sojae*. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1576(1-2):119-26.
- Chiuchetta SJ, De Castro-Prado MA. Vincristine induces somatic segregation, via mitotic crossing-over, in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. *Biol Res*. 2002; 35(1):31-8.
- Choi HJ, Kang OH, Park PS, Chae HS, Oh YC, Lee YS, Choi JG, Lee GH, Kweon OH, Kwon DY. Mume Fructus water extract inhibits pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Med Food*. 2007; 10(3):460-6.
- Chu G. Double strand break repair. *J Biol Chem*. 1997; 272(39):24097-100.
- Clutterbuck AJ. Synchronous nuclear division and septation in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol*. 1970; 60:133-5.
- Clutterbuck AJ. The validity of the *Aspergillus nidulans* linkage map. *Fungal Genet Biol*. 1997; 21(3):267-77.
- Colangelo J, Licon V, Benen J, Visser J, Bergmann C, Orlando R. Characterization of the N-linked glycosylation site of recombinant pectate lyase. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1999; 13(23):2382-7.
- Cramer R, Weichel M, Flückiger S, Glaser AG, Rhyner C. Fungal allergies: a yet unsolved problem. *Chem Immunol Allergy*. 2006; 91:121-33.
- Curry SL, Cogar SM, Cook JL. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: a review. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2005; 41(5):298-309.
- Czlapinski JL, Bertozzi CR. Synthetic glycobiology: Exploits in the Golgi compartment. *Curr Opin Chem Biol*. 2006; 10(6):645-51.
- Dancík V, Addona TA, Clauser KR, Vath JE, Pevzner PA. De novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry. *J Comput Biol*. 1999; 6(3-4):327-42.
- Dancík, V.; Addona, T. A.; Clauser, K. R.; Vath, J. E.; Pevzner, P. A. De novo peptide sequencing via tandem mass spectrometry. *J. Comput. Biol*. 1999; 6:327-42.
- Davidson J, Kerr A, Guy K, Rotondo D. Prostaglandin and fatty acid modulation of *Escherichia coli* O157 phagocytosis by human monocytic cells. *Immunology*. 1998; 94(2):228-34.

- Davies JD. Mammary ductal foam cells: macrophage immunophenotype for further cells? *Hum Pathol.* 1994; 25(2):214-5.
- de la Torre P, Reboli AC. Anidulafungin: a new echinocandin for candidal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2007; 5(1):45-52.
- Delacote F, Deriano L, Lambert S, Bertrand P, Saintigny Y, Lopez BS. Chronic exposure to sublethal doses of radiation mimetic Zeocintrade mark selects for clones deficient in homologous recombination. *Mutat Res.* 2007; 615(1-2):125-33.
- Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide syntase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1083(2):121-34.
- Dezotti NO, Zucchi TM. Identification of *Aspergillus nidulans* genes essential for the accumulation of sterigmatocystin. *Fungal Genet Biol.* 2001; 34(2):93-105.
- Di Rosa M, Sorrentino L. Some pharmacodynamic properties of carrageenin in the rat. *Br J Pharmacol.* 1970; 38(1):214-20.
- Diamond RD, Clark RA. Damage to *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* hyphae by oxidative and nonoxidative microbicidal products of human neutrophils *in vitro*. *Infect Immun.* 1982; 38(2):487-95.
- Diamond RD, Krzesicki R, Epstein B, Jao W. Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes *in vitro*. A possible host defense mechanism in aspergillosis and mucormycosis. *Am J Pathol.* 1978; 91(2):313-28.
- Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 1987; 12:13-15.
- Eisen JA, Hanawalt PC. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat Res.* 1999; 435(3):171-213.
- Eriksen SH, Jensen B, Olsen J. Effect of N-linked glycosylation on secretion, activity, and stability of alpha-amylase from *Aspergillus oryzae*. *Curr Microbiol.* 1998; 37(2):117-22.
- Espejel S, Franco S, Rodriguez-Perales S, Bouffler SD, Cigudosa JC, Blasco MA. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J.* 2002; 21(9):2207-19.
- Farges RC, da Silva MB, Frode TS. Implication of glucocorticoid in anti-inflammatory effects of Ro5-4864 in mouse pleurisy induced by carrageenan. *Life Sci.* 2006; 78(16):1814-22.
- Farman ML, Tosa Y, Nitta N, Leong SA. MAGGY, a retrotransposon in the genome of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Gen Genet.* 1996; 251(6):665-74.
- Felenbok B. The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the alcA-alcR system as a tool for the expression of recombinant proteins. *J Biotechnol.* 1991; 17(1):11-7. Review.
- Florey L. Elements of the vascular system. *Sci Basis Med Annu Rev.* 1969;:1-18. Review
- Fox LM. Ivermectin: uses and impact 20 years on. *Curr Opin Infect Dis.* 2006; 19(6):588-93.

- Frode TS, Medeiros YS. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Mediators Inflamm.* 2001; 10(4):223-7.
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, *et al.* Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature.* 2005; 438(7071):1105-15.
- Garcia Leme J, Hamamura L, Leite MP, Rocha e Silva M. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. *Br J Pharmacol.* 1973; 48(1):88-96.
- Garcia Leme J, Schapoval EES. Stimulation of hypothalamo.pituitary.adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue. *Br J Pharmacol.* 1975; 53:75-83.
- Gerritsen ME. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoides in the microcirculation. *Cardiov Res.* 1996; 54(3):654-59.
- Gibb W, Matthews SG, Challis JR. Localization and developmental changes in prostaglandin H synthase (PGHS) and PGHS messenger ribonucleic acid in ovine placenta through gestation. *Biol Reprod.* 1996; 54(3):654-9.
- Goldman GH, Kafer E. *Aspergillus nidulans* as a model system to characterize the DNA damage response in eukaryotes. *Fungal Genet Biol.* 2004; 41(4):428-42.
- Gordon S, Fraser I, Nath D, Hughes D, Clarke S. Macrophages in tissues and in vitro. *Curr Opin Immunol.* 1992; 4(1):25-32.
- Graf BA, Nazarenko DA, Borrello MA, Roberts LJ, Morrow JD, Palis J, Phipps RP. Biphenotypic B/macrophage cells express COX-1 and up-regulate COX-2 expression and prostaglandin E(2) production in response to pro-inflammatory signals. *Eur J Immunol.* 1999; 29(11):3793-803.
- Greenberg S. Modular components of phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 1999; 66(5):712-7.
- Grosser T. The pharmacology of selective inhibition of COX-2. *Thromb Haemost.* 2006; 96(4):393-400.
- Guest GM, Lin X, Momany M. *Aspergillus nidulans* RhoA is involved in polar growth, branching, and cell wall synthesis. *Fungal Genet Biol.* 2004; 41(1):13-22.
- Gwynne DI, Buxton FP, Sibley S, Davies RW, Lockington RA, Scazzocchio C, Sealy-Lewis HM. Comparison of the cis-acting control regions of two coordinately controlled genes involved in ethanol utilization in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* 1987; 51(2-3):205-16.
- Hammond TM, Keller NP. RNA silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA-dependent RNA polymerases. *Genetics.* 2005; 169(2):607-17.
- Hardin BD, Kelman BJ, Saxon A. Adverse human health effects associated with molds in the indoor environment. *J Occup Environ Med.* 2003; 45(5):470-8. Review.
- Harris RC, Breyer MD. Update on cyclooxygenase-2 inhibitors. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006; 1(2):236-45.
- Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 2002; 23(3):144-50.

- Hefti MH, Vervoort J, van Berkel WJ. Defflavination and reconstitution of flavoproteins. *Eur J Biochem.* 2003; 270(21):4227-42. Review.
- Helmer M, Lands WE. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem.* 1976; 251(18):5575-79.
- Hishida T, Iwasaki H, Ohno T, Morishita T, Shinagawa H. A yeast gene, MGS1, encoding a DNA-dependent AAA(+) ATPase is required to maintain genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(15):8283-9.
- Holsapple MP, Schnur M, Yim GK. Pharmacological modulation of edema mediated by prostaglandin, serotonin and histamine. *Agents Actions.* 1980; 10(4):368-73.
- James MJ, Penglis PS, Caughey GE, Demasi M, Cleland LG. Eicosanoid production by human monocytes: does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response? *Inflamm Res.* 2001; 50(5):249-53.
- Jiao W, Blunt JW, Cole AL, Munro MH. Fumagiringillin, a new fumagillin derivative from a strain of the fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Nat Prod.* 2004; 67(8):1434-7.
- Johnston RB Jr. Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med.* 1988; 318(12):747-52.
- Kafer E, May G. The *uvsF* gene region in *Aspergillus nidulans* codes for a protein with homology to DNA replication factor C. *Gene.* 1997; 191(2):155-9.
- Kafer E. An 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet.* 1958;9:105-45.
- Kaiser II, Gutierrez JM, Plummer D, Aird SD, Odell GV. The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. *Arch Biochem Biophys.* 1990; 278(2):319-25.
- Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, O'neil G. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology.* 1996; 111(2):445-54.
- Katzung BG. *Farmacologia básica e clínica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
- Kelly M, Hwang JM, Kubes P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120(1):3-10.
- Ketting RF, Haverkamp TH, van Luenen HG, Plasterk RH. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell.* 1999; 99(2):133-41.
- Kirkpatrick M, Jenkins CD. Genetic segregation and the maintenance of sexual reproduction. *Nature.* 1989; 339(6222):300-1.
- Kis B, Snipes A, Bari F, Busija DW. Regional distribution of cyclooxygenase-3 mRNA in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004; 126(1):78-80.
- Kis B, Snipes JA, Gaspar T, Lenzser G, Tulbert CD, Busija DW. Cloning of cyclooxygenase-1b (putative COX-3) in mouse. *Inflamm Res.* 2006; 55(7):274-8.

- Khaksari M, Shamsizadeh A, Azarang A, Mahmoodi M. W-7 (a calmodulin antagonist) inhibits carrageenan-induced paw edema in intact and adrenalectomized rats. *Pak J Pharm Sci.* 2007; 20(3):195-9.
- Kolinsky VI. Biochemical aspects of inflammation. *Biochemistry.* 2007; 72(6):595-607.
- Kurtz MB, Champe SP. Dominant spore color mutants of *Aspergillus nidulans* defective in germination and sexual development. *J Bacteriol.* 1981; 148(2):629-38.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-85.
- Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(2):310-50.
- Laue L, Kawai S, Brandon DD, Brightwell D, Barnes K, Knazek RA, Loriaux DL, Chrousos GP. Receptor-mediated effects of glucocorticoids on inflammation: enhancement of the inflammatory response with a glucocorticoid antagonist. *J Steroid Biochem.* 1988; 29(6):591-8.
- Lehr HA, Arfors KE. Mechanisms of tissue damage by leukocytes. *Curr Opin Hematol.* 1994; 1(1):92-9.
- Lentsch AB, Ward PA. Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol.* 2000; 190(3):343-48.
- Letavayova L, Markova E, Hermanska K, Vlckova V, Vlasakova D, Chovanec M, Brozmanova J. Relative contribution of homologous recombination and non-homologous end-joining to DNA double-strand break repair after oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst).* 2006; 5(5):602-10.
- Levitt NC, Hickson ID. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol Med.* 2002; 8(4):179-86. Review.
- Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol.* 2005; 67(1):15-9.
- Loram LC, Fuller A, Fick LG, Cartmell T, Poole S, Mitchell D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *J Pain.* 2007; 8(2):127-36.
- Mable BK, Otto SP. Masking and purging mutations following EMS treatment in haploid, diploid and tetraploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Genet Res.* 2001; 77(1):9-26.
- MacCabe AP, Orejas M, Tamayo EN, Villanueva A, Ramón D. Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *J Biotechnol.* 2002; 96(1):43-54.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. nitric oxid and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15:1312-21.
- Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect Dis Clin North Am.* 2002; 16(4):875-94, vi. Review.

- Mehrad B, Strieter RM, Moore TA, Tsai WC, Lira SA, Standiford TJ. CXC chemokine receptor-2 ligands are necessary components of neutrophil-mediated host defense in invasive pulmonary aspergillosis. *J Immunol.* 1999; 163(11):6086-94.
- Mehrad B, Strieter RM, Standiford TJ. Role of TNF-alpha in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J Immunol.* 1999; 162(3):1633-40.
- Metcalf D. Antigen-induced proliferation in vitro of bone marrow precursors of granulocytes and macrophages. *Immunology.* 1971; 20(5):727-38.
- Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(5):2164-73.
- Mouyna I, Henry C, Doering TL, Latge JP. Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 237(2):317-24.
- Murakami M, Nakatani Y, Kuwata H, Kudo I. Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A2s. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1488:159-66.
- Nagai H, Guo J, Choi H, Kurup V. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha protect mice from invasive aspergillosis. *J Infect Dis.* 1995; 172(6):1554-60.
- Nakai T, Hatano K, Ikeda F, Shibuya K. Electron microscopic findings for micafungin-treated experimental pulmonary aspergillosis in mice. *Med Mycol.* 2005; 43(5):439-45.
- Nakamura H, Shimizu M. Early and delayed phases of hind paw edema in rats. *Jpn J Pharmacol.* 1974; 24(3):393-405.
- Narumiya S, Fitzgerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.* 2001; 108(1):25-30.
- Nataraj C, Thomas DW, Tilley SL, Nguyen MT, Mannon R, Koller BH, Coffman TM. Receptors for prostaglandin E(2) that regulate cellular immune responses in the mouse. *J Clin Invest.* 2001; 108(8):1229-35.
- Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics.* 2006; 172(3):1557-66.
- Nielsen ML, Hermansen TD, Aleksenko A. A family of DNA repeats in *Aspergillus nidulans* has assimilated degenerated retrotransposons. *Mol Genet Genomics.* 2001; 265(5):883-7.
- Noguchi K, Maeda M, Ruwanpura SM, Ishikawa I. Prostaglandin E2 (PGE2) downregulates interleukin (IL)-1 alpha-induced IL-6 production via EP2/EP4 subtypes of PGE2 receptors in human periodontal ligament cells. *Oral Dis.* 2005; 11(3):157-62.
- Nozawa SR, May GS, Martinez-Rossi NM, Ferreira-Nozawa MS, Coutinho-Netto J, Maccheroni W Jr, Rossi A. Mutation in a calpain-like protease affects the posttranslational mannosylation of phosphatases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol.* 2003; 38(2):220-7.
- Ochi T, Goto T. Differential effect of FR122047, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, in rat chronic models of arthritis. *Br J Pharmacol.* 2002; 135(3):782-88.

- Oka M, Maruyama J, Arioka M, Nakajima H, Kitamoto K. Molecular cloning and functional characterization of *avaB*, a gene encoding Vam6p/Vps39p-like protein in *Aspergillus nidulans*. FEMS Microbiol Lett. 2004; 232:113-21.
- Oka T, Hamaguchi T, Sameshima Y, Goto M, Furukawa K. Molecular characterization of protein O-mannosyltransferase and its involvement in cell-wall synthesis in *Aspergillus nidulans*. Microbiology. 2004; 150(6):1973-82.
- Olsen UB, Eltorp CT, Ingvarsdén BK, Jørgensen TK, Lundbaek JA, Thomsen C, Hansen AJ. ReN 1869, a novel tricyclic antihistamine, is active against neurogenic pain and inflammation. Eur J Pharmacol. 2002; 435(1):43-57.
- Orr HA, Otto SP. Does diploidy increase the rate of adaptation? Genetics. 1994; 136(4):1475-80.
- Oshero N, May GS. The molecular mechanisms of conidial germination. FEMS Microbiol Lett. 2001; 199(2):153-60.
- Oyanagui Y, Sato S. Inhibition by nifedipine of ischemic and carrageenan paw edema as well as of superoxide radical production from neutrophils and xanthine oxidase. Arzneimittelforschung. 1991; 41(5):469-74.
- Panchal T, Wodzinski RJ. Comparison of glycosylation patterns of phytase from *Aspergillus niger* (A. *ficuum*) NRRL 3135 and recombinant phytase. Prep Biochem Biotechnol. 1998; 28(3):201-17.
- Paull TT, Gellert M. The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. Mol Cell. 1998; 1(7):969-79.
- Perlinska-Lenart U, Kurzatkowski W, Janas P, Kopinska A, Palamarczyk G, Kruszewska JS. Protein production and secretion in an *Aspergillus nidulans* mutant impaired in glycosylation. Acta Biochim Pol. 2005; 52(1):195-206.
- Perrot V, Richerd S, Valéro M. Transition from haploidy to diploidy. Nature. 1991; 351(6324):315-7.
- Pitcher RS, Tonkin LM, Green AJ, Doherty AJ. Domain structure of a NHEJ DNA repair ligase from *Mycobacterium tuberculosis*. J Mol Biol. 2005; 351(3):531-44.
- Poliout , Gilbert C, Borgeat P, Poubelle PE, Bourgoïn S, Cremion C, Maclouf J, McColl SR, Naccache PH. Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. FASEB J. 1998; 12(12):1109-23.
- Pontecorvo G, Kafer E. Genetic analysis based on mitotic recombination. Adv Genet. 1958; 9:71-104.
- Pontecorvo G, Roper JA, Forbes E. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. J Gen Microbiol. 1953; 8(1):198-210.
- Pontecorvo G. Non-random distribution of multiple mitotic crossing-over among nuclei of heterozygous diploid *Aspergillus*. Nature. 1952; 170(4318):204-5.
- Pontecorvo G. The parasexual cycle in fungi. Annu Rev Microbiol. 1956; 10:393-400.
- Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA, Isakson PC. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. J Exp Med. 1996; 184(3): 883-91.

- Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol*. 2004; 142(2):331-8.
- Prudden J, Evans JS, Hussey SP, Deans B, O'Neill P, Thacker J, Humphrey T. Pathway utilization in response to a site-specific DNA double-strand break in fission yeast. *EMBO J*. 2003; 22(6):1419-30.
- Punt PJ, Strauss J, Smit R, Kinghorn JR, van den Hondel CA, Scazzocchio C. The intergenic region between the divergently transcribed *niiA* and *niaD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multiple NirA binding sites which act bidirectionally. *Mol Cell Biol*. 1995; 15(10):5688-99.
- Queiroz JCF, Teixeira CFP, Lebrun I, Spencer PJ, Zucchi TMAD. A glycoprotein with anti-inflammatory properties secreted by an *Aspergillus nidulans* modified strain. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 2007; 13(2):527-543.
- Record E, Asther M, Marion D, Asther M. Purification and characterization of a novel specific phosphatidylglycerol-phosphatidylinositol transfer protein with high activity from *Aspergillus oryzae*. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1256(1):18-24.
- Regnault C, Roch-Arveiller M, Florentin I, Giroud JP, Postaire E, Delaforge M. Kinetic evaluation of nitric oxide production in pleural exudate after induction of two inflammatory reactions in the rat. *Inflammation*. 1996; 20(6):613-22.
- Rex JH, Bennett JE, Gallin JI, Malech HL, Melnick DA. Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J Infect Dis*. 1990; 162(2):523-8.
- Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. A review. *Am J Pathol*. 1977; 86(1):183-276.
- Sakaguchi Y, Shirahase H, Kunishiro K, Ichikawa A, Kanda M, Uehara Y. Synergistic effect of nitric oxide synthase and cyclooxygenase inhibitors on carrageenan-induced paw edema in rats. *Arzneimittelforschung*. 2006; 56(10):695-9.
- Sarau HM, Foley JJ, Schmidt DB, Martin LD, Webb EF, Tzimas MN, et al. In vitro and in vivo pharmacological characterization of SB 201993, an eicosanoid-like LTB4 receptor antagonist with anti-inflammatory activity. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999; 61(1):55-64.
- Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest*. 1982; 69(3):617-31.
- Scott T, Owens MD. Thrombocytes respond to lipopolysaccharide through Toll-like receptor-4, and MAP kinase and NF-kappaB pathways leading to expression of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 with production of prostaglandin E2. *Mol Immunol*. 2008; 45(4):1001-8.
- Sedgwick AD, Moore AR, Al-Duaij A, Willoughby DA. Studies into the association between leukocyte accumulation and oedema formation. *Agents Actions*. 1985; 17(2):209-13

- Segal BH, DeCarlo ES, Kwon-Chung KJ, Malech HL, Gallin JI, Holland SM. *Aspergillus nidulans* infection in chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)*. 1998; 77(5):345-54. Review
- Serhan CN, Takano T, Maddox JF. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and stable analogs on lipoxin A4 are potent inhibitor of acute inflammation. Receptor and pathways. *Adv Exp Med Biol*. 1999; 447:133-49.
- Shah A, Panchal N, Agarwal AK. Concomitant allergic bronchopulmonary aspergillosis and allergic *Aspergillus* sinusitis: a review of an uncommon association*. *Clin Exp Allergy*. 2001; 31(12):1896-905.
- Shaw BD, Momany M. *Aspergillus nidulans* polarity mutant *swoA* is complemented by protein O-mannosyltransferase *pmtA*. *Fungal Genet Biol*. 2002; 37(3):263-70.
- Shibuya K, Ando T, Hasegawa C, Wakayama M, Hamatani S, Hatori T, Nagayama T, Nonaka H. Pathophysiology of pulmonary aspergillosis. *J Infect Chemother*. 2004; 10(3):138-45.
- Shibuya K, Paris S, Ando T, Nakayama H, Hatori T, Latge JP. Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2006; 47(4):249-55.
- Silverthorn DU. *Fisiologia humana. Uma abordagem integrada*. Barueri: Manole; 2003.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isoenzymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Am Soc Pharmacol Exp Ther*. 2004; 56:387-437.
- Singh G, Triadafilopoulos G. Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications. *J Rheumatol Suppl*. 1999; 56:18-24.
- Smit AFA. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev*. 1999; 9:657-663.
- Sorensen TK, Dyer PS, Fierro F, Laube U, Peberdy JF. Characterisation of the *gptA* gene, encoding UDP N-acetylglucosamine: dolichol phosphate N-acetylglucosaminylphosphoryl transferase, from the filamentous fungus, *Aspergillus niger*. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1619(1):89-97.
- Spencer A, Morozov-Roche LA, Noppe W, MacKenzie DA, Jeenes DJ, Joniau M, Dobson CM, Archer DB. Expression, purification, and characterization of the recombinant calcium-binding equine lysozyme secreted by the filamentous fungus *Aspergillus niger*: comparisons with the production of hen and human lysozymes. *Protein Expr Purif*. 1999; 16(1):171-80.
- Srinivasan K, Muruganandan S, Lal J, Chandra S, Tandan SK, Prakash VR. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Pongamia pinnata* leaves in rats. *J Ethnopharmacol*. 2001; 78(2-3):151-7.
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*. 1999; 99(2):123-32.
- Tachibana A. Genetic and physiological regulation of non-homologous end-joining in mammalian cells. *Adv Biophys*. 2004; 38:21-44. Review.

- Takayama K, García-Cardena G, Sukhova GK, Comander J, Gimbrone MA, Libby P. Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J Biol Chem*. 2002; 277(46): 44147-54.
- Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, Hashimoto K, Kangawa K, Kojima M, Ito S, Watanabe K. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 291:884-9.
- Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon*. 2003; 42(8):947-62.
- Timberlake WE, Clutterbuck AJ. Genetic regulation of conidiation. *Prog Ind Microbiol*. 1994; 29:383-427.
- Timberlake WE, Marshall MA. Genetic regulation of development in *Aspergillus nidulans*. *Trends Genet*. 1988; 4(6):162-9.
- Todd RB, Davis MA, Hynes MJ. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: heterokaryons and diploids for dominance, complementation and haploidization analyses. *Nat Protoc*. 2007; 2(4):822-30.
- Tomlinson A, Appleton I, Moore AR, Gilroy DW, Willis D, Mitchell JA, Willoughby DA. Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. *Br J Pharmacol*. 1994; 113(3):693-8.
- Tsitsigiannis DI, Bok JW, Andes D, Nielsen KF, Frisvad JC, Keller NP. *Aspergillus* cyclooxygenase-like enzymes are associated with prostaglandin production and virulence. *Infect Immun*. 2005; 73(8):4548-59.
- Ueda N, Yamashita R, Yamamoto S, Ishimura K. Induction of cyclooxygenase-1 in a human megakarioblastic cell line (CMK) differentiated by phorbol ester. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1344(1): 103-10.
- van de Vate C, Jansen GJ. Meiotic recombination in a duplication strain of *Aspergillus nidulans*. *Genet Res*. 1978; 31(1):29-52.
- van Heemst D, Swart K, Holub EF, van Dijk R, Offenberg HH, Goosen T, van den Broek HW, Heyting C. Cloning, sequencing, disruption and phenotypic analysis of *uvsC*, an *Aspergillus nidulans* homologue of yeast RAD51. *Mol Gen Genet*. 1997; 254(6):654-64.
- Vastenhouw NL, Fischer SE, Robert VJ, Thijssen KL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Plasterk RH. A genome-wide screen identifies 27 genes involved in transposon silencing in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2003; 13(15):1311-6.
- Veith D, Scherr N, Efimov VP, Fischer R. Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci*. 2005; 118(16):3705-16.
- Walmsley AR, Hooper NM. Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequence is independent of distance from the C-terminus in membrane dipeptidase. *Glycobiology*. 2003; 13(9):641-6.
- Weinreich DM, Watson RA, Chao L. Perspective: Sign epistasis and genetic constraint on evolutionary trajectories. *Evolution Int J Org Evolution*. 2005; 59(6):1165-74.

- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(22):6531-5.
- Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR, Gilroy D. Resolution of inflammation. *Int J Immunopharmacol.* 2000; 22(12):1131-5.
- Wilson TE, Lieber MR. Efficient processing of DNA ends during yeast nonhomologous end joining. Evidence for a DNA polymerase beta (Pol4)-dependent pathway. *J Biol Chem.* 1999; 274:23599–609.
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science.* 2001; 291(5507):1284-9.
- Wu KK. Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. *Prostagl Leuk Essential Fatty Acids.* 2005; 72:89-93.
- Yamada M, Niki H, Yamashita M, Mue S, Ohuchi K. Prostaglandin E2 production dependent upon Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 and its contradictory modulation by Auranofin in rat peritoneal macrophage. *J Pharma Exp Tharapeutics.* 1997; 281(2): 1005-11.
- Yamagishi K, Enomoto T, Ohmiya Y. Perfusion-culture-based secreted bioluminescence reporter assay in living cells. *Anal Biochem.* 2006; 354(1):15-21.
- Yamashita M, Niki H, Yamada M, Watanabe-Kobayashi M, Mue S, Ohuchi K. Dual effects of auranofin on prostaglandin E₂ production by rat peritoneal macrophages. *Euro J Pharmacol.* 1997; 325:221-7.
- Yang S, Smit AF, Schwartz S, Chiaromonte F, Roskin KM, Haussler D, Miller W, Hardison RC. Patterns of insertions and their covariation with substitutions in the rat, mouse, and human genomes. *Genome Res.* 2004; 14(4):517-27.
- Yang T, Sun D, Huang YG, Smart A, Briggs JP, Schnermann JB. Differential regulation of COX-2 expression in the kidney by lipopolysaccharide: role of CD14. *Am J Physiol.* 1999; 277(1 Pt 2):10-6.
- Yokomizo T, Ogawa Y, Uozumi N, Kume K, Izumi T, Shimizu T. cDNA cloning and mutagenesis study of leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase. *Adv Exp Med Biol.* 1997;407:151-6.
- Yu CL, Huang MH, Kung YY, Tsai YY, Tsai ST, Huang DF, Sun KH, Han SH, Yu HS. Interleukin-13 increases prostaglandin E2 (PGE(2)) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. *Inflamm Res.* 1998; 47(4):167-73.
- Yuhki K, Ueno A, Naraba H, Kojima F, Ushikubi F, Narumiya S, Oh-ishi S. Prostaglandin receptors EP2, EP3, and IP mediate exudate formation in carrageenin-induced mouse pleurisy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 311(3):1218-24.
- Zeyl C, Vanderford T, Carter M. An evolutionary advantage of haploidy in large yeast populations. *Science.* 2003; 299(5606):555-8.
- Zucchi TM, Cunha FQ, Ribeiro RA, Ferreira SH, De Lucca FL. Transformation of *Aspergillus nidulans* by RNA from rat macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1996; 42(2):235-40.

ANEXO

Meios e Soluções

Hidrolisado de ácido nucléico de levedura

- 2 g de ácido nucléico em 15 mL de solução 1N de NaOH (RNA)
- 2 g de ácido nucléico em 15 mL de solução 1N de HCl (DNA)

As duas soluções são aquecidas por 20 minutos em banho-maria e misturadas.

O pH ajustado para 6.0. A mistura é filtrada e o volume completado com água destilada para 40 mL. Conservada a 4° C com 1 mL de clorofórmio.

Meio mínimo concentrado – para estoque

NaNO ₃	60 g
KH ₂ PO ₄	15,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,2 g
	5,0 g

KCl

FeSO ₄ . 7H ₂ O	10 mg
CuSO ₄ . 7H ₂ O	10 mg
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	10 mg
H ₂ O q.s.p	1000 mL

Colocar clorofórmio e conservar em geladeira em frasco escuro

Solução estoque de vitaminas

Biotina	2 mg
Piridoxina	50 mg
Paba	50 mg
Ácido Fólico	50 mg
Nicotinamida	100 mg
Ácido Pantotênico	200 mg
Cloreto de colina	200 mg
Riboflavina	100 mg
B-mesoinositol	400 mg
Tiamina	50 mg
H ₂ O q.s.p	200 mL

Esterilizar em banho-maria por 15 minutos. Adicionar 1 mL de clorofórmio e manter na geladeira. Usar Frasco escuro

Meio mínimo líquido

- 100 mL solução MM 10X concentrado
- 10 g de glicose

Completar o volume para 1000 mL com água destilada. Acertar o pH para 6.0 e autoclavar.

Solução estoque de riboflavina

- 0,1 g riboflavina
- 500 mL água deionizada

A concentração final será de 0,2 mg/mL. Usar 1 mL/200 mL de meio. Esterilizar em banho-maria por 20 minutos. Conservar em frasco escuro a 4° C com 10 mL de clorofórmio.

Solução estoque de ácido paraminobenzóico (PABA)

- 0,0685 mg PABA
- 500 mL de água

A concentração final será de 0,137 mg/mL. Usar 1 mL/200 mL meio. Esterilizar em banho-maria por 20 minutos e conservar em frasco escuro a 4° C. Adicionar 10 mL de clorofórmio.

Solução estoque de biotina

- 2 mg Biotina
- 500 mL de água

A concentração final será de 0,004 mg/mL. Usar 1 mL/200 mL meio. Esterilizar em banho-maria por 20 minutos. Conservar em frasco escuro 4° C. Acrescentar 10 mL de clorofórmio.

Solução estoque de L-metionina

- 1 g metionina
- 500 mL de água

A concentração final será de 2 mg/mL. Usar 2 mL/200 mL de meio. Esterilizar em banho-maria por 20 minutos. Usar frasco escuro. Adicionar 10 mL de clorofórmio.

Solução estoque de piridoxina

- 0,05 g Piridoxina
- 500 mL de água

A concentração final será de 0,1 mg/mL. Usar 1 mL/200 mL meio – Esterilizar em banho-maria por 20 minutos. Conservar em frasco escuro a 4° C- Acrescentar 10 mL de clorofórmio.

Solução estoque de acriflavina

- 2500 mg Acriflavina
- 500 mL de água

A concentração final será de 5fmg/mL. Usar 2,5 mL/200 mL MC. Usar 0,25 mL/200 mL MM. Dissolver em banho-maria por 20 minutos. Guardar em frasco escuro a 4° C com clorofórmio.

Solução estoque de tiosulfato de sódio

- 124 g de tiosulfato de sódio
- 500 mL água deionizada

A concentração final será de 248 mg/mL. Usar 1 mL/200 mL meio. Conservar em frasco escuro a 4° C com clorofórmio.

Solução estoque de ácido nicotínico

- 0,1 g de ácido nicotínico
- 500 mL de água deionizada

A concentração final será de 0,2 mg/mL. Usar 1mL/200 mL de meio. Esterilizar em banho maria por 20 minutos. Guardar em frasco escuro a 4° C. Adicionar 10 mL de clorofórmio

Meio completo líquido a partir de solução estoque

Solução concentrada de MM	100 mL
Glicose	10 g
Peptona	2 g
Casaminoácido	1g
Solução estoque vitaminas	2 mL
Solução estoque de hidrolisado de ácido nucléico de levedura	2,5 mL
H ₂ O q.s.p	1000 mL
Ajustar o pH para 6.0 e autoclavar	

Meio completo sólido a partir de solução estoque

Adicionar 12 g agar/litro, após acertar pH 6,0 – autoclavar

Meio seletivo

Possui a mesma composição do MM, adiciona-se para cada 1000 mL, um ou mais dos seguintes suplementos, conforme os requerimentos das linhagens:

Prolina	10 mg
Biotina	0,02 mg
Piridoxina	0,5 mg
PABA	0,7 mg
D-Metionina	20 mg
Riboflavina	1 mg
Acriflavina	25 mg
Tiosulfato de sódio	248 g
Ac. Nicotínico	0,2 g

EDTA 0,5 M pH 8,0

EDTA (PM 372,24)	186,1 g
Água q.s.p.	1000 mL
Ajustar o pH para 8,0 (Usa-se NaOH)	

TRIS HCl 1 M

Tris Base	121,1 g
Água q.s.p.	1000 mL

Ajustar o pH para 8,0 (Usa-se HCl concentrado). A solução deve atingir a temperatura ambiente para ajuste fino do pH.

TBE 10X

Tris Base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	40 mL
Água q.s.p.	1000 mL

TE

Tris HCl 1 M	1 mL
EDTA 0,5 M	0,2 mL
Água q.s.p.	100 mL

CTAB 2%

CTAB	2 g
NaCl	8,12 g
PVP 40	1 g
EDTA 0,5 M	4 mL
Tris HCl 1 M	10 mL
Água q.s.p.	100 mL

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

NaCl	2,04 g
Na ₂ SO ₃	0,6 g
Tris-Cl pH 7,5	0,06 g
EDTA	0,93 g
SDS	0,5 g
Água q.s.p.	50 mL

TAMPÃO DE CARREGAMENTO (1mL)

Sacarose	400 mg
Azul de bromofenol	2,5 mg
20 µg de brometo de etídeo (2 µL de solução 10 mg/mL)	
TE	1 mL

Solução de Salina/Tween

NaCl	8,5 g
------	-------

Tween 80	0,01%
Água q.s.p.	1000 mL

Meio de Cultura RPMI (Solução estoque)

RPMI 1640	10,4g
Ma ₂ HCO ₃	2,0g
Hepes	2,383g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Solução de RPMI pH 7,2 (Solução de uso)

Solução estoque de RPMI	100 mL
L-glutamina	1,0 mL
Garamicina	50 µL

Solução de glutamina (2mM)

L-glutamina	0,292g
Solução salina q.s.p.	1000 mL

Soluções para dosagem da lactato desidogenase (LDH)**Solução tampão fosfato 0,1M pH 7,4**

Solução A	
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	28 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Solução B	
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	28 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Tampão de uso

Solução A	1,9 mL
Solução B	8,1 mL
NaCl	0,23 g
NADH	0,0028 g
Piruvato de sódio	0,32 mL
Água destilada q.s.p.	20 mL

Soluções para *western blot***Tampão Tris-HCl 2M**

Tris base	24,2 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Tampão Tris-HCl 1M

Tris base	12,1 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução SDS 10%

SDS	10 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução azul de bromofenol 1%

Azul de bromofenol	0,1 g
Água destilada q.s.p.	10 mL

Solução de acrilamida 30% (Solução A)

Acrilamida	29,2 g
Bis-acrilamida	0,8 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução para o gel de separação (Solução B)

Tampão Tris-HCl 2M (pH 8,8)	75 mL
SDS 10%	4 mL
Água destilada	21 mL

Solução para o gel de empilhamento (Solução C)

Tampão Tris-HCl 1M (pH 6,8)	50 mL
SDS 10%	4 mL
Água destilada	46 mL

Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio	0,5 g
Água destilada	5 mL

Tampão de eletroforese (pH 8,3)

Tris	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
Água destilada q.s.p.	1 L

Tampão de transferência

Tris	3 g
Glicina	14,4 g
Água destilada q.s.p.	1 L

Tampão de lavagem (pH 7,2)

NaCl	4 g
KCl	0,1 g
Tris	1,5 g
Tween-20	0,5 mL
Água destilada q.s.p.	500 mL

Gel de separação 10%

Solução A	3,33 mL
Solução B	2,5 mL

Água destilada	4,0 mL
Persulfato de amônio	50 µL
TEMED	10 µL

Gel de empilhamento

Solução A	0,67 mL
Solução C	1,0 mL
Água destilada	2,3 mL
Persulfato de amônio	30 µL
TEMED	5 µL

Corante Comassie Blue R

Comassie Blue (R-250)	0,5 g
Metanol	225 mL
Ácido acético	50 mL
Água destilada q.s.p.	500 mL

Solução descorante

Etanol	5 mL
Ácido acético	10 mL
Água destilada q.s.p.	100 mL

Solução Ponceau-S

Corante de Ponceau-S	0,2 g
Ácido tricloroacético	3 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Tampão de amostra (Tampão Laemmli)

Tampão Tris 1 M (pH 6,8)	0,44 mL
SDS 20%	1,11 mL
Glicerol	1,11 mL
Mercaptoetanol	111 µL
Corante Azul de Bromofenol 1%	222 µL
Água destilada q.s.p.	10 mL

Tampão “Stripping”

Tampão Tris 0,5 M (pH 6,8)	1,25 mL
SDS 20%	2 mL
Mercaptoetanol	25 µL
Água destilada q.s.p.	10 mL

Coloração por Nitrato de Prata**Solução Fixadora**

50 mL metanol
12 mL ácido acético
50 µL formaldeído 37%
Água destilada qsp 100mL

Solução de Lavagem

Etanol 50% (300 mL)

Solução de Tiosulfato de Sódio

20 mg de tiosulfato
Água destilada qsp 100 mL

Solução de Nitrato de Prata

200 mg de nitrato de prata
75 µL formaldeído 37%
Água Milli Q qsp 100 mL

Solução Reveladora

6g carbonato de sódio
50 µL formaldeído 37%
2 µL tiosulfato de sódio 2% (20 mg em 1 mL)
Água Milli Q qsp 100 mL

Solução Stop

50 mL metanol
12 mL ácido acético
Água destilada qsp 100 mL

Protocolo de Coloração

Soluções	Tempo
Fixadora	Overnight
Lavagem	3 X 20 min
Tiosulfato	1 min
Água destilada	3 X 20 segundos
Nitrato de prata	20 min
Água destilada	2 X 2 min
Reveladora	Até aparecer as bandas
Água destilada	2 x 2 min
Stop	10 min

Manter gel em metanol 50%