

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Ingrid Selhorst

**Padronização de métodos para estudos com o nematódeo *Caenorhabditis
elegans*: enfoque em sistemas antioxidantes**

Florianópolis

2021

Ingrid Selhorst

Padronização de métodos para estudos com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*: enfoque em sistemas antioxidantes

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas
Orientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Selhorst, Ingrid

Padronização de métodos para estudos com o nematódeo
Caenorhabditis elegans: enfoque em sistemas antioxidantes
/ Ingrid Selhorst ; orientador, Alcir Luiz Dafre, 2021.
63 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis,
2021.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Caenorhabditis elegans. 3.
Degradação de peróxido. 4. Glutathione. 5. Tiol. I. Dafre,
Alcir Luiz. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Ingrid Selhorst

Padronização de métodos para estudos com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*: enfoque em sistemas antioxidantes

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Licenciada e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 12 de abril de 2021.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Marcelo Farina
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Danielle Ferraz Mello
Avaliadora
Pós-doutorado pela Duke University

Dedico este trabalho em memória do meu pai, que me ensinou a importância dos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, por todo o apoio durante os anos de graduação. À minha mãe, Luzia, pelo suporte em diferentes aspectos e por ter compreendido minha ausência em diversos momentos. Aos meus irmãos, Renata, Rodrigo e Filipe por sempre me incentivarem e apoiarem minhas decisões.

Aos meus amigos, que me proporcionaram vários bons momentos de descontração e que me deram apoio emocional. Agradeço especialmente a Gabi, com quem eu tive o prazer de morar e dividir minhas vivências diariamente. Também àqueles amigos que fiz durante a graduação, com quem compartilhei incertezas, momentos de estudos, de desespero, de festas e de bar depois da aula. Amanda, Andreza, Barbara, Flávio, Juliano, Lucas, Monique, William e Zé, sou muito grata por ter conhecido vocês!

Faço um agradecimento especial à Barbara e à Monique, que, além de compartilharem as vivências da graduação comigo desde o início, também dividiram os momentos no laboratório e na vida. À Barbara por me lembrar de pensar positivo e por sempre se preocupar comigo. Vou sempre me lembrar com carinho dos nossos cafezinhos em casa. À Monique por ser sempre tão parceira e por ter dividido comigo os perrengues no início da iniciação científica. Vou sempre me lembrar com carinho da época que nós éramos a “mesma pessoa” no laboratório.

A todos os colegas do LABDEF, por todas as discussões sobre ciência e por sempre estarem dispostos a me ajudar e elucidar minhas dúvidas. Agradeço particularmente ao Gudrian, que foi meu parceiro no laboratório e um amigo e me ensinou muito durante a iniciação científica. Obrigada por me ajudar sempre que precisei, mesmo a distâncias continentais.

Ao professor Alcir, pela orientação e por todas as oportunidades que me proporcionou durante a iniciação científica. Obrigada por todos os ensinamentos e pela confiança no meu trabalho.

Aos colegas do LBMBL, do LBMBI e à técnica Gabriela por todos os momentos de descontração dentro e fora do laboratório e por terem me ajudado e elucidado minhas dúvidas diversas vezes.

Ao professor Marcelo Farina, pela contribuição em nossas discussões sobre os experimentos com o *C. elegans*. Obrigada à Josiane e à Tanara por terem

trabalhado na instalação do *C. elegans* no laboratório e por terem me ensinado sobre o modelo.

À Universidade Federal de Santa Catarina pelo espaço e pelo ensino de qualidade. Agradeço ao Laboratório de Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pela disponibilização de sua infraestrutura.

RESUMO

O *Caenorhabditis elegans* é um nematódeo com o hábito de vida livre. Por conta do ciclo de vida curto, genoma com grande homologia com humanos e facilidade na obtenção de cepas mutantes, sua utilização como modelo de pesquisa vem se tornando cada vez mais relevante. Dentre os genes homólogos entre *C. elegans* e mamíferos, estão os relacionados às defesas antioxidantes. Em destaque, está a glutathiona (GSH), que é um tripeptídeo antioxidante com participação na manutenção do estado redox da célula. Além disso, a GSH é importante como cofator para a eliminação de peróxidos através da enzima glutathiona peroxidase. Excesso de peróxidos causa distresse oxidativo, onde a quantidade de agentes oxidativos está acima da capacidade de eliminação da célula, e, por consequência, leva a danos oxidativos em biomoléculas. A capacidade para eliminar peróxidos é importante para a vitalidade celular. Tendo em vista o movimento no meio científico para reduzir a utilização de animais vertebrados nas pesquisas e a versatilidade do *C. elegans* como modelo de pesquisa, propusemos neste trabalho a padronização e adaptação de métodos referentes à otimização do manuseio e preparo de amostras, quantificação de tióis e peróxidos, além da verificação da compatibilidade de anticorpos com amostras de *C. elegans* através da técnica Western blot. Verificamos que a forma de centrifugação mais branda e eficaz para as lavagens entre tratamentos em microtubos é de 150 g por 15 segundos. Identificamos também que 4 sessões de sonicação de 10 segundos são suficientes para o rompimento completo dos vermes e obtenção de extratos proteicos com alta concentração. Testamos anticorpos contra peroxirredoxinas e tioredoxinas, porém, nenhum dos anticorpos testados se mostrou específico para as proteínas de interesse. Padronizamos a técnica de detecção de peróxidos no meio de cultivo dos vermes. Foi possível acompanhar a degradação de peróxidos orgânicos com 100 a 500 vermes em 500 µL de meio e com 100 a 200 µM de peróxido de cumeno, cujo máximo de decaimento se ajusta a uma curva de decaimento de segunda ordem. Por fim, foi possível quantificar os níveis de tióis proteicos, tióis não proteicos e glutathiona total em amostras de *C. elegans*. Em suma, estabelecemos com sucesso um método de sedimentação dos vermes e preparo de amostras de *C. elegans*. Estabelecemos as técnicas para quantificar a degradação *in vivo* de peróxidos pelos vermes e as condições para o ensaio de tióis solúveis (NPSH, GSH-t) e proteicos (PSH) em extrato ácido do verme. Podemos concluir que as metodologias foram eficazes em seus propósitos e abrem perspectivas de sua utilização em estudos científicos envolvendo o *C. elegans*, principalmente a respeito dos sistemas antioxidantes.

Palavras-chave: *Caenorhabditis elegans*. Métodos analíticos e de preparo. Degradação de peróxido. Glutathiona. Tióis não proteicos. Tióis proteicos.

ABSTRACT

The *Caenorhabditis elegans* is a free-living nematode. Due to its short life cycle, high genome homology with humans, and facility in obtaining mutant strains, its use as a research model has become more relevant. Among the homologous genes between *C. elegans* and mammals, are those related to antioxidant defenses. Highlighted is glutathione (GSH), which is an antioxidant tripeptide with a role in the cell redox state maintenance. GSH is also important as a cofactor for the peroxide elimination through the enzyme glutathione peroxidase. Peroxides excess causes oxidative distress, where the amount of oxidative agents is higher than the cell's elimination capacity, and, consequently, leads to oxidative damage in biomolecules. The ability to eliminate peroxides is important for cellular vitality. In view of the scientific community movement to reduce the vertebrate animals use in research and the *C. elegans* versatility as a research model, we proposed in this work the standardization and adaptation of methods related to the handling and samples preparation optimization, and thiols and peroxides quantification. In addition, we checked the antibody compatibility with *C. elegans* samples using the Western blot technique. We found that the mildest and most effective centrifugation for washing between treatments in microtubes is 150 *g* for 15 seconds. We also identified that 4 10-second sonication sessions are sufficient for the worms complete breaking to obtain a high concentration protein extract. We tested antibodies against peroxiredoxins and thioredoxins, however, none of the tested antibodies proved to be protein specific. It was possible to monitor the peroxides degradation with 100 to 500 worms in 500 μL of medium with cumene peroxide 100 to 200 μM , which the maximum peroxide decay adjusts to a second order decay curve. Finally, it was possible to quantify the protein thiols, non-protein thiols and total glutathione levels in *C. elegans* samples. In conclusion, we have successfully established a *C. elegans* sedimenting method and sample preparation. We established a technique to quantify the *in vivo* worm peroxide degradation and the conditions for testing soluble thiols (NPSH, GSH-t) and protein (PSH) in acidic worm extract. We can conclude that the methodologies were effective in their purposes and open perspectives for their use in scientific studies involving the *C. elegans*, mainly about antioxidant systems.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*. Analytical and preparation methods. Peroxide degradation. Glutathione. Non-protein thiols. Protein thiols.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do <i>Caenorhabditis elegans</i>	16
Figura 2 – Reações do ensaio para medida de glutathiona total	23
Figura 3 – Resumo do ensaio do xilenol laranja.....	25
Figura 4 – Cultivo dos animais	30
Figura 5 – Protocolo para sedimentação dos vermes	31
Figura 6 – Protocolo para teste de preparo de extrato	32
Figura 7 – Protocolo para preparo de Western Blotting	33
Figura 8 – Fluxograma do preparo de amostra para avaliação dos níveis de tióis....	35
Figura 9 – Fluxograma da avaliação dos níveis de tióis proteicos	36
Figura 10 – Fluxograma da avaliação dos níveis de tióis não proteicos	37
Figura 11 – Sedimentação de vermes L4 em microtubos de 1,5 mL	40
Figura 12 – Extração de proteína após sonicações de 10 segundos	41
Figura 13 – Testagem de anticorpos.....	43
Figura 14 – Degradação de hidroperóxido de cumeno	45
Figura 15 – Níveis de tióis em <i>C. elegans</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração de proteína de amostras sonicadas	42
Tabela 2 – Anticorpos utilizados nos testes de Western blot	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHP	Peróxido de cumeno
DTNB	Ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FOX	Método de oxidação férrica e xilenol laranja
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSH-t	Glutaciona total
GSSG	Dissulfeto da glutaciona ou glutaciona oxidada
GS-TNB	Dissulfeto entre a glutaciona e o TNB
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
N2	Cepa de <i>C. elegans</i> selvagem
NADH(P)	Nicotinamina adenina dinucleotídeo (fosfato)
NPSH	Tióis não proteicos
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
OP50	Cepa de <i>Escherichia coli</i> resistente a estreptomicina
Prx	Peroxirredoxina
PSH	Tióis proteicos
THP	Hidroperóxido de terc-butila
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
Trx	Tiorredoxina
VE01	Cepa mutante de <i>C. elegans</i> - prdx-2 (gk169) II
VZ130	Cepa mutante de <i>C. elegans</i> - Trx-1 (ok1449) II; trx-2 (tm2720) V

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	BIOLOGIA DO VERME <i>Caenorhabditis elegans</i>	15
1.2	ASPECTOS RELATIVOS AO CULTIVO DO <i>Caenorhabditis elegans</i>	17
1.3	TIÓIS E SINALIZAÇÃO REDOX	19
1.3.1	Métodos para detecção de glutathiona	21
1.4	HIDROPERÓXIDOS.....	23
1.4.1	Método para detecção de peróxidos	24
2	JUSTIFICATIVA.....	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	ANIMAIS E CULTIVO PADRÃO.....	29
4.2	TESTE SEDIMENTAÇÃO DOS VERMES	31
4.3	TESTE DE PREPARO DE EXTRATO.....	31
4.4	WESTERN BLOTTING.....	32
4.5	ENSAIO DE PERÓXIDOS COM XILENOL LARANJA	33
4.6	NÍVEIS DE GLUTATHIONA, TIÓIS PROTEICOS E TIÓIS NÃO PROTEICOS 34	
4.6.1	Tratamentos e preparo das amostras.....	34
4.6.2	Avaliação dos níveis de tióis proteicos (PSH).....	35
4.6.3	Avaliação dos níveis de glutathiona total (GSH-t) e tióis não proteicos (NPSH) 36	
4.6.3.1	<i>Glutathiona total</i>	37
4.6.3.2	<i>Tióis não proteicos totais</i>	37

4.7	DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	38
4.7.1	Método de Peterson	38
4.7.2	Método de Bradford	38
5	RESULTADOS.....	39
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	51
8	REFERÊNCIAS.....	52
	APÊNDICE A – Protocolos de execução	59

1 INTRODUÇÃO

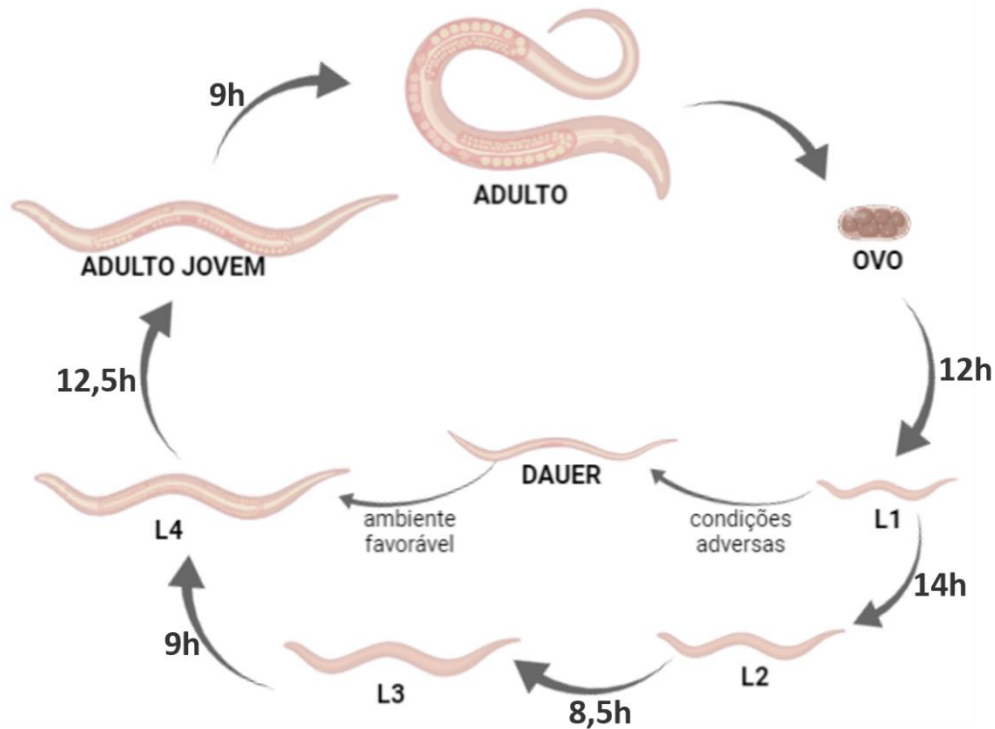
1.1 BIOLOGIA DO VERME *Caenorhabditis elegans*

O *Caenorhabditis elegans* é um animal vermiforme e não segmentado, sendo um dos poucos integrantes do filo Nematoda com hábito de vida livre (BRUSCA; MOORE; SHUSTER, 2018). Na natureza, ele é encontrado em sua forma reprodutivamente ativa principalmente em material vegetal em decomposição. Nestes locais, este verme encontra bactérias em abundância, as quais utiliza para sua alimentação (FRÉZAL; FÉLIX, 2015).

Uma população de *C. elegans* é androdíica, ou seja, nela existem machos e hermafroditas. Normalmente, os machos são formados em casos de não disjunção cromossômica e contêm apenas um cromossomo sexual X (X0), enquanto os hermafroditas possuem dois (XX). Em condições laboratoriais, onde ocorre autofertilização dos hermafroditas, estes vermes são encontrados, normalmente, na proporção aproximada de 1:1000 (macho:hermafrodita) (FRÉZAL; FÉLIX, 2015).

Ao longo do desenvolvimento, este verme passa por quatro estágios larvais antes de se tornar um adulto reprodutivo. Quando cultivados com temperatura próxima de 20°C e com abundância de alimento, o adulto leva cerca de 24 horas para maturar o ovo, ainda dentro do corpo (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). Após o ovo ser expelido, o embrião leva ~12 horas para se desenvolver e eclodir em larva L1. A partir deste ponto, esse primeiro estágio larval dura ~14 horas e os estágios L2, L3 e L4 duram ~8,5, 9 e 12,5 horas, respectivamente. Assim, ~44 horas após deixar o ovo, o animal chega ao estágio de adulto jovem e ~9 horas após, já está apto a pôr ovos (Figura 1) (BYERLY; CASSADA; RUSSELL, 1976).

Figura 1. Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans*. Esta representação considera um ambiente laboratorial a 20 °C e com abundância de alimento. As imagens não representam a escala real.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Em solo pobre em recursos alimentares, condição esta não propícia para o desenvolvimento larval convencional, os vermes estacionam no estágio dauer, um estágio de resistência. Os animais dauer são capazes de sobreviver meses sem comida, podendo ser dispersos para outros locais neste período (Frézal e Félix, 2015). Os animais que se diferenciam em dauer não passam pelos estágios larvais L2 e L3. Ao invés disso, quando as condições voltam a ser favoráveis, eles se desenvolvem diretamente para o estágio L4 e depois para adultos (FRÉZAL; FÉLIX, 2015).

As camadas mais externas do corpo do *C. elegans* compõem a cutícula. De acordo com sua composição, ela é considerada uma matriz extracelular, contendo sobretudo colágeno, outras proteínas e moléculas não proteicas. Esta composição resulta em uma camada resistente, responsável pelo revestimento e pela manutenção da forma e da integridade do corpo do nematódeo. Externamente à cutícula, ainda há a epicutícula, que faz contato direto com o ambiente. Ela é formada internamente por uma camada lipídica e, externamente, por glicoproteínas carregadas negativamente. A cutícula é trocada quatro vezes ao longo da vida do animal, sendo uma a cada

mudança de estágio larval. Ainda durante o período embrionário, ocorre a formação da primeira cutícula, que permanecerá durante a fase L1. Posteriormente, ocorrem mudas durante as transições L1-L2, L2-L3, L3-L4 e L4-adulto, sendo que esta última cutícula permanece até a morte do animal. Apesar de todas essas trocas, o verme não fica nenhum período completamente sem proteção. Isso porque durante a síntese das cutículas, com exceção da embrionária, as células da hipoderme iniciam a produção da nova cutícula antes mesmo da muda. Ou seja, ao fim de cada estágio larval o animal possui duas cutículas (PAGE, 2007).

Quanto ao seu uso na pesquisa, é possível utilizar o *C. elegans* para estudos de envelhecimento, na neurociência e para estudos de mecanismos bioquímicos. Uma das vantagens é seu curto tempo de vida (cerca de 21 dias), além do fato de, dentre 959 células somáticas, 302 serem neurônios e possuir cerca de 60-80% de seu genoma homólogo com os humanos. Tamanha similaridade permite que seja usado também como um modelo para estudos de doenças, pois dos 2466 genes relacionados a doenças no genoma humano, 533 estão presentes no genoma do *C. elegans*. Dessa forma, é possível estudar mais rapidamente os mecanismos envolvidos em uma doença, além de ter um baixo custo, quando comparado com modelos de mamíferos (KALETTA; HENGARTNER, 2006). Por exemplo, o *C. elegans* é considerado um ótimo modelo para pesquisas envolvendo a Doença de Alzheimer (SUNDARAM'; GREENWALD, 1993).

1.2 ASPECTOS RELATIVOS AO CULTIVO DO *Caenorhabditis elegans*

Após isolar o *C. elegans* da natureza, Sydney Brenner o apresentou em 1973 como um bom modelo para ser utilizado na pesquisa. Dentre os aspectos positivos, estão o tamanho pequeno, o rápido ciclo de vida, a facilidade para reprodução e o fato de ser um animal hermafrodita com autofecundação (BRENNER, 1974). Este modelo se mostrou vantajoso a partir de então, permitindo sua exploração em diferentes áreas. Durante sua vida, cada hermafrodita gera em torno de 300 ovos, sendo que cada um deles se desenvolve e está pondo mais ovos em 3 dias. Tendo em vista que em cada placa de Petri de 100 mm podem ser cultivados centenas de animais, em pouco tempo se consegue uma quantidade significativa de vermes para os mais diversos experimentos (TEJEDA-BENITEZ; OLIVERO-VERBEL, 2016).

Por serem organismos pluricelulares, facilmente cultivados em placas de Petri e alimentados com bactéria (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015), o *C. elegans* pode ser analisado como um todo, se assim o pesquisador o desejar.

Em laboratório, este verme é comumente cultivado em placas de Petri com ágar. Além disso, um biofilme de bactérias é adicionado à superfície para sua alimentação, geralmente da espécie *Escherichia coli* (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). Para a manutenção da cultura, os animais devem ser replicados antes que as bactérias acabem. Geralmente, os animais podem permanecer na mesma placa até a 3ª geração, entretanto, o tempo varia dependendo do número inicial de animais inseridos na placa, do genótipo da cepa e da temperatura. É importante que os animais não passem períodos sem alimento, pois isso interfere no seu metabolismo, expressão gênica e até mesmo pode resultar na formação dos estágio dauer a partir das larvas L1 (STIERNAGLE, 2006). Essas mudanças decorrente da inanição podem influenciar, inclusive, no metabolismo e crescimento da prole (HIBSHMAN; HUNG; BAUGH, 2016). Na falta de alimento, outras fases, que não a L1, podem entrar em estágio de quiescência (MOOSAVI; HATAM, 2018).

Se existir a necessidade, as cepas de *C. elegans* podem ser congeladas e mantidas por anos. A presença de glicerol na solução de congelamento, faz com que não ocorra a formação de cristais de gelo, que poderiam romper suas células (HU, 2007; STIERNAGLE, 2006). Em geral, prefere-se utilizar animais em estágio L1 e L2 para o congelamento, pois apresentam maior sucesso em sobrevivência ao processo (STIERNAGLE, 2006).

Para a realização de experimentos, é preciso uma cultura homogênea em relação à idade dos animais. Neste sentido, utilizam-se placas com muitos hermafroditas grávidos, para que haja bastante ovos. Em seguida, uma das formas de se realizar a sincronização é através da aplicação de força física e química associadas, com o uso de hipoclorito e hidróxido de sódio, que rompem todos os animais já eclodidos, para que então restem somente os ovos. Assim, a nova cultura destinada à experimentação, que partirá destes ovos, terá animais com idades próximas entre eles. A partir daí, se aguarda até que os animais atinjam a idade que o pesquisador deseja para o seu estudo (PORTA-DE-LA-RIVA *et al.*, 2012). As condições ideais de temperatura para o cultivo das cepas variam dependendo de suas mutações (STRAIN LIST - CAENORHABDITIS GENETICS CENTER (CGC) - COLLEGE OF BIOLOGICAL SCIENCES, [s. d.]). Entretanto, a exposição a

temperaturas acima de 27 °C tornam os animais estéreis (PETRELLA, 2014) e acima de 25 °C com a longevidade reduzida (HOSONO *et al.*, 1982).

1.3 TIÓIS E SINALIZAÇÃO REDOX

Dentre os diversos genes com homologia entre o *C. elegans* e os mamíferos, estão os que codificam para as proteínas da cadeia transportadora de elétrons. Isso fornece potencial para gerar mais energia para o animal, mas também pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), visto que os processos para síntese de ATP (adenosina trifosfato) na mitocôndria são uma das principais fontes endógenas dessas moléculas. As EROs mais comumente referidas na literatura são o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas moléculas possuem alta reatividade, podendo causar danos oxidativos nas células. Entretanto, elas também desempenham papéis fundamentais na sinalização celular, atuando como segundos mensageiros celulares (MORENO-ARRIOLA *et al.*, 2014).

Para a manutenção da homeostase celular, o *C. elegans* conta, assim como os mamíferos, com enzimas que fazem a eliminação de algumas EROs, as quais têm potencial para causar danos oxidativos nas células. A enzima superóxido dismutase atua sobre o $O_2^{\bullet-}$, convertendo-o em H_2O_2 e oxigênio molecular. Apesar de ser uma ERO, o H_2O_2 não é um radical e tem baixa reatividade relativa se comparada às espécies radicalares. Por sua vez, o H_2O_2 pode ser eliminado por várias peroxidases, dentre elas a catalase, as peroxirredoxinas (Prx) ou a glutathiona peroxidase (GPx) (MORENO-ARRIOLA *et al.*, 2014).

A glutathiona (GSH) é um importante tiol que, de forma geral, mantém o estado reduzido da célula, atuando como sequestradora de radicais livres, na regulação de proteínas, como cofator de enzimas antioxidantes e na eliminação de xenobióticos. Por ser encontrada em grande quantidade na célula, a razão entre seu estado reduzido e oxidado (GSH/GSSG) é um importante indicador do estado redox celular (FERGUSON; BRIDGE, 2019), este sendo o balanço entre as moléculas pró-oxidantes e as antioxidantes na célula (RIERA, 2012). No verme, a proporção de GSH/GSSG em estado saudável é mantida por volta de 70/1. A glutathiona redutase (GR) é uma enzima capaz de reduzir GSSG novamente em GSH, com gasto de nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). A taxa GSH/GSSG é mantida

pelo equilíbrio entre os processos que levam a oxidação da GSH (e.g. EROs e ação da GPx) e de processos que levam à sua redução, este predominantemente catalisado pela enzima GR. O *C. elegans* é considerado um bom organismo para estudos relacionados à homeostase da GSH, visto que sua via de síntese e regulação é homóloga a de mamíferos. O fator de transcrição SKN-1 (do inglês *protein skinhead 1*), assim como seu homólogo NRF2 (fator nuclear E2 relacionado ao fator 2) em mamífero, é translocado para o núcleo em condições oxidativas e é responsável pela transcrição, dentre outras proteínas relacionadas às defesas antioxidantes, da glutamato cisteína ligase. Esta enzima é limitante na síntese de GSH e catalisa a ligação de glutamato e cisteína em γ -glutamilcisteína, que então é unida à glicina pela glutathione sintase, tendo como produto final o tripeptídeo GSH (FERGUSON; BRIDGE, 2019).

Outro papel da GSH é a participação na S-glutationilação, ou tiolação proteica, onde ela é capaz de formar dissulfetos mistos com resíduos de cisteína em proteínas, interferindo assim na sinalização redox celular. Esta é uma ligação reversível, de forma que a célula apresenta mecanismos para removê-la, como por exemplo, pela ação da enzima glutarredoxina, que catalisa a desglutationilação da proteína tiolada (FERGUSON; BRIDGE, 2019). A S-glutationilação proteica é de grande importância em um cenário oxidativo, havendo a ligação da GSH de forma reversível e assim prevenindo que ocorram oxidações permanentes na proteína e preservando o seu funcionamento (DALLE-DONNE *et al.*, 2007). Os métodos que estimam o conteúdo total de glutathione normalmente não consideram as moléculas que estão ligadas a proteínas, subestimando assim a sua real medida (SIES, 1999).

Parte do processo de envelhecimento consiste no acúmulo de moléculas com dano. Em parte, esse dano é causado por EROs, que são capazes de oxidar diferentes biomoléculas: proteínas, bases nitrogenadas e lipídeos. Entretanto, o mecanismo com o qual as EROs colaboram com o envelhecimento é ainda ambíguo (LIGUORI *et al.*, 2018). Além disso, existem evidências de que o aumento na quantidade de EROs está relacionado com o desenvolvimento de algumas doenças, incluindo o câncer. O aumento dessas moléculas pode levar a dano ao DNA, podendo resultar em mutações em moléculas e alteração de vias de sinalização e metabolismo (KLAUNIG, 2019).

As EROs também têm relação com a sinalização redox, mecanismo onde moléculas oxidadas/reduzidas desempenham um papel na sinalização celular. Esse mecanismo geralmente envolve um sinal, um sensor, um ou mais transdutores de

sinal e um alvo. O sensor é um agente redutor que percebe a sinalização diretamente de uma molécula oxidativa, chamada de sinal. Já os transdutores de sinal percebem essa sinalização do sensor ou de outros transdutores de sinais, já que em uma mesma via de sinalização podem haver vários transdutores de sinal. As moléculas que melhor desempenham o papel de sinal são aquelas mais estáveis, sendo o H_2O_2 uma delas. Dentre as moléculas que são mais reativas, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ ainda é estável o suficiente para atuar como sinalizador e pode se ligar reversivelmente com grupos heme. Esta sinalização redox, em geral, é intermediada por proteínas contendo cisteína, que apresentam um ou mais grupos tióis (-SH). Desta forma, o sinal é percebido por uma proteína sensor, que a transmite para um transdutor de sinal, que, por sua vez, ativa ou inibe o alvo por oxidação, este sendo frequentemente um fator de transcrição. Acredita-se que redoxinas, como a Prx, atuariam tanto como sensor quanto como transdutora de sinal. As tioredoxinas (Trx) teriam maior potencial como transdutoras de sinal. (FLOHÉ, 2010). Do ponto de vista dos sistemas antioxidantes, a ativação da sinalização redox através de um sinal oxidativo é uma forma de regulação do próprio sistema. Isso porque o principal fator de transcrição para enzimas antioxidantes é o NRF2, que por sua vez pode ser ativado por oxidação via sinalização redox (SILVA-ISLAS; MALDONADO, 2018).

1.3.1 Métodos para detecção de glutathiona

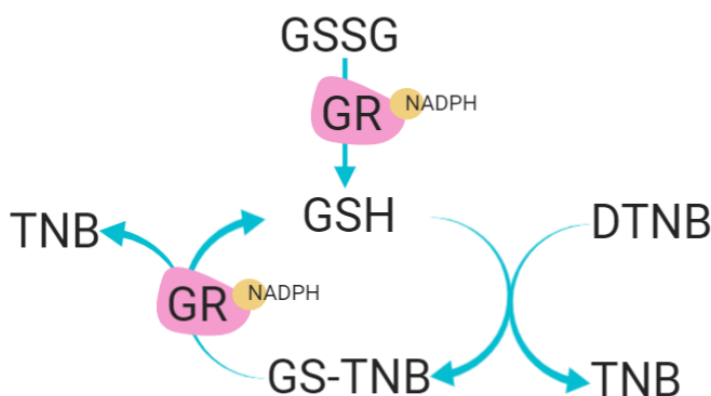
Atualmente, existem diferentes meios pelos quais podemos estimar a quantidade de GSH em uma amostra biológica. Os principais métodos envolvem reações enzimáticas e não-enzimáticas, mas os níveis de GSH também podem ser medidos por cromatografia líquida de alta eficiência (BRUNDU *et al.*, 2016), kits (LI, Jie *et al.*, 2014), ou até mesmo por técnicas histológicas (MASTROBERARDINO *et al.*, 2008). Um destes é um método não-enzimático para detectar tióis não proteicos (NPSH), dos quais, em células de mamíferos, a GSH constitui 95% (DELUCIA *et al.*, 1975). Este método de Ellman (1959), apesar de inespecífico, nos permite avaliar os níveis da forma reduzida (do GSH) com certa segurança. No ensaio de NPSH, as proteínas e componentes celulares são precipitados em meio ácido, liberando moléculas solúveis em ácido, como a GSH. Esta, quando presente na amostra, reage com o ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), formando um dissulfeto misto

com um ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (GS-TNB), e liberando um segundo TNB, o qual pode ser medido espectrofotometricamente em 412 nm (ELLMAN, 1959).

Da mesma forma, foram desenvolvidos métodos para a quantificação de tióis proteicos (PSH) cuja detecção já era possível com o método de Ellman (1959). Entretanto, assim como no caso da detecção de NPSH, a formação de dissulfetos interfere na quantificação, de forma que elas precisam ser desfeitas. Por outro lado, é possível se medir o estado redox destes tióis comparando-se os tióis disponíveis para quantificação antes e depois da redução de todos os tióis, que representa os tióis reduzidos e oxidados, respectivamente. Além da forma colorimétrica utilizando-se DTNB, é possível detectar os níveis de PSH de amostras biológicas através de géis com adutos fluorescentes, cromatografia líquida de alta eficiência ou sensores moleculares fluorescentes (WINTHER; THORPE, 2014).

Um dos métodos enzimáticos mais utilizados foi proposto por Tietze (1969) e aprimorado e adaptado desde sua publicação em 1969 (GRIFFITH, 1980; RAHMAN; KODE; BISWAS, 2006) e vem sendo utilizado em diferentes modelos de pesquisa (BAKER; CERNIGLIA; ZAMAN, 1990; LI, Ning *et al.*, 2003), incluindo o *C. elegans* (CAITO; ASCHNER, 2015). No método de Tietze (Figura 2), da mesma forma que no método NPSH, a GSH se associa ao DTNB e forma GS-TNB e TNB. A GR, que é adicionada ao meio, reduz o dissulfeto GS-TNB as custas de NADPH, resultando em GSH e TNB. A GSH novamente reage com uma molécula de DTNB, liberando GS-TNB e TNB, em um ciclo ininterrupto. A reação continuará enquanto houver DTNB e NADPH no meio de reação. Fatores que inibem a GR podem afetar a eficácia do método, e devem ser considerados. A forma dissulfeto da GSH (GSSG), quando presente na amostra, também é reduzida pela ação da GR. Desta forma, medindo-se a taxa de formação de TNB, este com absorvância máxima em 412nm, podemos medir indiretamente o conteúdo total de glutathiona (GSH + GSSG) de uma amostra. Geralmente, os valores são estimados baseando-se em uma curva padrão com GSH ou GSSG (RAHMAN; KODE; BISWAS, 2006).

Figura 2. Reações do ensaio para medida de glutatona total. A GSH presente na amostra, ou liberada pela GR na redução de GSSG, faz uma ligação dissulfeto com TNB proveniente do DNTB, formando uma molécula de GS-TNB e liberando outra na forma de TNB. O dissulfeto GS-TNB é reduzido pela glutatona redutase (GR), liberando GSH e TNB. A enzima GR tem como cofator o NADPH. A GSH liberada reinicia o ciclo. O conteúdo total de GSH da amostra (GSSG + GSH) é mensurado pela taxa de formação do TNB em 412 nm.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

1.4 HIDROPERÓXIDOS

O H_2O_2 é formado na célula a partir de reações provenientes de NADPH/NADH oxidases, da cadeia respiratória da mitocôndria e da atividade enzimática da superóxido dismutase e outras oxidases. O H_2O_2 possui função essencial na manutenção do eustresse celular por conta de seu papel na sinalização redox. O estado de eustresse se trata de uma produção fisiológica de moléculas oxidativas, onde estas moléculas desempenham um papel regulatório na célula, contribuindo para a manutenção de sua homeostasia. Esta regulação é principalmente em relação aos fatores de transcrição que regulam os sistemas antioxidantes, entre outros. Assim, por fim, em uma condição de eustresse, a produção moderada de espécies oxidativas permite ao organismo ter respostas fisiológicas adaptativas ao estímulo redox, sendo considerada como parte integral da vida celular. Entretanto, quando em altas concentrações, o H_2O_2 passa a contribuir para o distresse oxidativo, onde as concentrações de espécies reativas são altas e processos deletérios ocorrem por conta do dano oxidativo. Este dano ocorre tanto em proteínas, quanto em lipídios,

DNA, RNA e carboidratos, havendo o comprometimento do funcionamento das organelas e podendo até levar à morte celular (NIKI, 2016; SIES, 2017).

O pKa de uma molécula é dado pelo pH em que ela está metade em seu estado ionizado, sendo útil para medir a força de um ácido. Hipoteticamente, se uma molécula apresenta pKa 3, sabemos que em pH 7 ela estará majoritariamente em seu estado ionizado e terá preferência para reagir com moléculas com o pKa alto, que, nesse ambiente, estarão principalmente em seu estado não-ionizado (TYMOCZKO; BERG; STRYER, 2011). Portanto, por possuir o pKa de 11,6, o H₂O₂ reage preferencialmente e mais rapidamente com moléculas de baixo pKa. A maioria dos tióis possuem alto pKa e, portanto, têm baixa reatividade com este peróxido. Algumas proteínas são exceção a esta baixa reatividade. Dentre elas, estão a catalase, a GPx e a Prx, que fazem a eliminação do H₂O₂ com altas taxas de reação (WINTERBOURN, 2013).

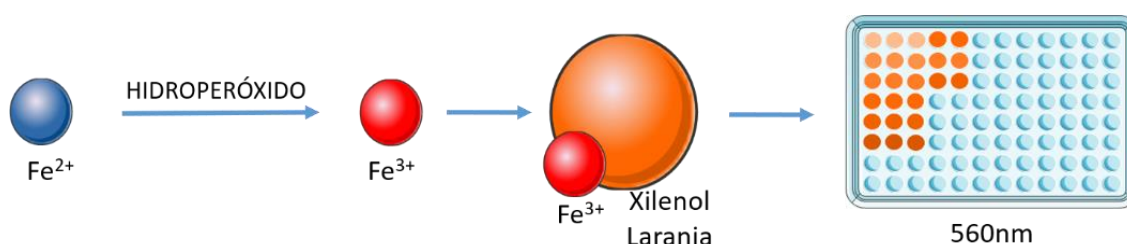
O H₂O₂ pode reagir com metais de transição na denominada reação de Fenton, no caso do ferro, ou tipo Fenton, no caso da reação do H₂O₂ com outros metais, como o cobre. Ao reagirem com metais durante as reações de Fenton ou tipo Fenton, o H₂O₂ gera produtos e intermediários ainda mais reativos do que ele próprio. Dentre eles, estão metais com estado de reatividade elevado, tais como Fe(H₂O₂)²⁺ e Fe⁴⁺. Outro produto desta reação é o OH• que tem uma reatividade tão alta que impede o seu deslocamento (difusão), reagindo no local de sua formação. O OH• tem grande potencial para gerar danos celulares por sua alta reatividade e baixa especificidade, podendo iniciar uma cascata de lipoperoxidação pela reação com fosfolipídeos, oxidação e potencial perda de função de proteínas ou até oxidação de bases nitrogenadas, levando a dano ao DNA (WINTERBOURN, 2013, 1995).

1.4.1 Método para detecção de peróxidos

A medida dos níveis de hidropéroxidos de uma amostra é uma forma indireta de avaliar se a célula está sob uma pressão oxidativa mais intensa, ou se há maior dano em biomoléculas quando peróxidos lipídicos, proteicos e de ácidos nucleicos são avaliados. Neste sentido, diferentes métodos para este fim são utilizados em diversos modelos biológicos (ŽAMOJĆ *et al.*, 2016). Entretanto, poucas dessas ferramentas foram utilizadas em *C. elegans*.

Uma das ferramentas utilizadas para mensurar o conteúdo de hidroperóxidos de uma amostra biológica é o método de oxidação férrica e xilenol laranja (FOX). Neste ensaio puramente químico, Fe^{2+} é adicionado a um meio ácido. Este é oxidado a Fe^{3+} pelo hidroperóxido, e uma vez formado, o Fe^{3+} se conjuga ao xilenol laranja formando um complexo que pode ser detectado espectrofotometricamente em 560 nm (GAY; GEBICKI, 2002) (Figura 3).

Figura 3. Resumo do ensaio com o xilenol laranja. O hidroperóxido oxida o Fe^{2+} em Fe^{3+} , que forma um complexo com o xilenol laranja, sendo detectado em 560nm.



Fonte: Elaborada pela autora (2019).

Apesar de ser um método simples e acessível, o FOX possui vários potenciais interferentes. O cuidado neste sentido deve se iniciar ainda na etapa de preparo das soluções e na escolha dos materiais utilizados no método. O ferro deve ser diluído em solução ácida, já que em pH acima de 7,0 o Fe^{2+} é instável e rapidamente convertido em Fe^{3+} . Mesmo nesta condição, o Fe^{2+} pode ser oxidado ao longo do tempo. Assim, é importante que a solução seja utilizada logo após sua preparação. Além disso, é possível que haja contaminação de metais através dos materiais utilizados caso não haja a limpeza que garanta a eliminação desses metais. Outra fonte extra de metais é através de reagentes de baixa pureza (BOU *et al.*, 2008).

O uso de amostras biológicas no ensaio do FOX é um potencial interferente para o método. A presença de ácido ascórbico acima de 100 μM durante a reação resulta em um incremento na coloração. O uso de tecidos com alta concentração de ferro, como o sangue, pode resultar em uma hiperestimação da quantidade de peróxido (BOU *et al.*, 2008). A presença de tampões em amostras biológicas representa um problema, visto que isto pode interferir na estabilidade do pH ácido do ensaio, interferindo no resultado. Entretanto, viu-se que a substituição do ácido sulfúrico pelo ácido perclórico estende a faixa de pH onde o complexo xilenol-férrico

apresenta absorvância em 560 nm (GAY; GEBICKI, 2002). Contudo, o método com esta condição ainda não foi padronizado para a utilização em *C. elegans*.

Outro fator a ser levado em conta é que a taxa de formação do complexo xilenol-ferro-férrico varia de acordo com o tipo de peróxido analisado. Portanto, a análise de amostras com diferentes tipos de peróxidos em diferentes proporções entre si pode levar a resultados não confiáveis (GAY; GEBICKI, 2002).

2 JUSTIFICATIVA

As orientações para o uso de animais na pesquisa incluem o exercício de reduzir o número, refinar os métodos utilizados e procurar sempre que possível alternativas para substituir o uso de animais, sobretudo os vertebrados. Sendo estes os 3 Rs, do inglês *reduction, refinement e replacement* (DOKE; DHAWALE, 2015). O *C. elegans* é um importante modelo para testes em toxicologia, sendo cultivado e mantido de forma simples e ainda assim fornecendo dados referentes ao animal como um todo, o que envolve interação e sinalização entre diferentes tipos celulares e sistemas. Se tratando de estudos toxicológicos, é comum que os testes sejam realizados e comparados dentre diferentes modelos de estudo (HUNT, 2017). Neste sentido, pesquisas com o *C. elegans* indicaram que este é um bom modelo preditivo para mamíferos, o que possibilita uma abordagem mais focada com estes animais. (HUNT; OLEJNIK; SPRANDO, 2012).

Tendo em vista o apresentado em termos de execução, necessidade de equipamentos e reagentes, em experimentos toxicológicos é preferível que os métodos utilizados nos diferentes modelos sejam os mesmos. Por conta disso, é necessário expandirmos as técnicas utilizadas com o *C. elegans*, dando preferência aos métodos já utilizados com outros modelos animais.

O *C. elegans* é um animal muito sensível a diferentes estímulos, sendo capaz de perceber o ambiente através dos seus neurônios. Alguns desses são específicos para respostas a estímulos mecânicos (GOODMAN; SENGUPTA, 2019). Portanto, um dos desafios encontrados em pesquisas que utilizam o verme é de cultivá-los de tal forma que a manipulação interfira o mínimo possível.

Nas pesquisas com o *C. elegans* é comum que se utilize cepas mutantes disponíveis. O CGC tem um banco com deleções de todo genoma de *C. elegans* e é de fácil acesso (STRAIN LIST - CAENORHABDITIS GENETICS CENTER (CGC) - COLLEGE OF BIOLOGICAL SCIENCES, [s. d.]). Entretanto, nem sempre apenas este recurso é suficiente, sendo preciso recorrer a metodologias diferenciadas que permitam chegar às respostas desejadas (ASPERNIG *et al.*, 2019; CROMBIE *et al.*, 2016). Isto reforça a importância de se desenvolver ou adaptar metodologias para pesquisas com o nematódeo, de forma a expandir as possibilidades deste modelo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer métodos funcionais para estudos com o verme *C. elegans*, voltados para otimização de procedimentos e estudos bioquímicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir uma forma de sedimentar os vermes em microtubos de forma menos estressora possível;
- Otimizar o preparo de amostras;
- Verificar a compatibilidade dos anticorpos comuns com as respectivas proteínas homólogas em *C. elegans*;
- Padronizar a detecção de GSH e outros tióis em amostras de *C. elegans*;
- Padronizar um método de consumo de peróxido *in vivo* para *C. elegans*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E CULTIVO PADRÃO

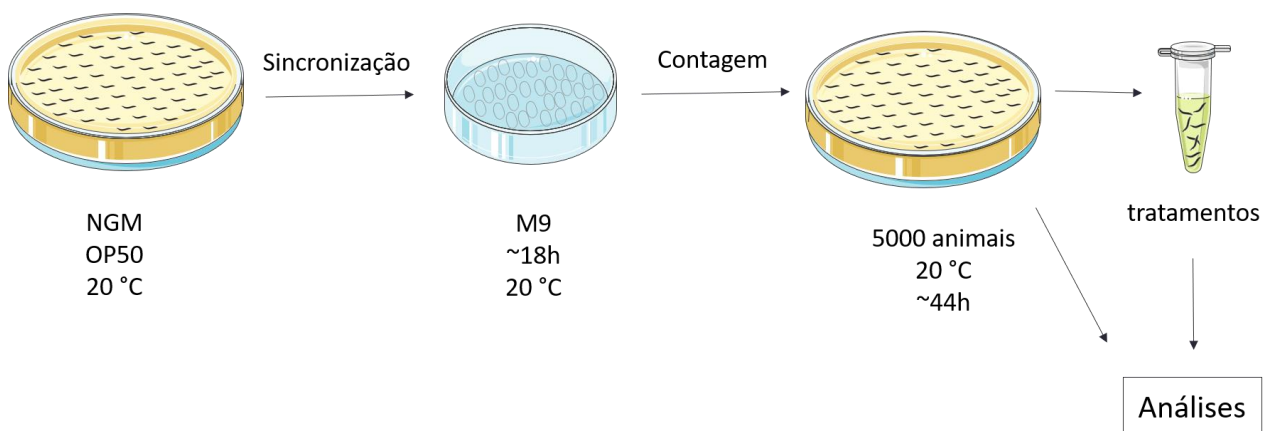
As cepas utilizadas, selvagem (N2), mutante para Trx1/2 (VZ130) [Trx-1 (ok1449) II; trx-2 (tm2720) V] e mutante para Prx (VE01) [prdx-2 (gk169) II], foram cedidas pelo professor Félix Alexandre Antunes Soares da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram mantidos em placas de Petri (100 mm) com o meio de cultivo *nematode growth medium* (NGM) contendo ágar 50 mM; NaCl 50 mM; peptona 20 mg/mL; colesterol 5 µg/mL; CaCl₂ 1 mM; MgSO₄ 1 mM; tampão fosfato e potássio pH 6,0 25 mM; nistatina 12,5 UI/mL; estreptomicina 50 µg/mL. As placas foram recobertas com um filme de bactérias *Escherichia coli* OP50 cultivadas previamente em meio Luria Bertani (LB) e crescidas nas placas a 37 °C por 24 horas.

Para os experimentos, um pedaço de ágar com animais de aproximadamente 1 cm² de uma placa de cultivo foi transferida para uma nova placa de 100 mM, sendo essa incubada por cerca de 3 dias a 20 °C. Em sequência, essas placas ricas em animais hermafroditas grávidos foram lavadas 3 vezes com água ultrapura estéril para retirar os ovos e os animais, sendo alocados em tubos de 15 mL preenchidos até 11 mL e centrifugados a 2600 g por 2 minutos entre cada lavagem e o sobrenadante descartado, para que possam ser preenchidos novamente com o conteúdo da lavagem das placas. Ao fim do processo de lavagem das placas, foi então adicionado 5 mL de solução NaClO 0,8% e NaOH 0,5 M ao pellet de animais que foram então sincronizados sob agitação vertical manual constante nos tubos durante 5 minutos. Ao fim do processo, o volume do tubo foi imediatamente completado até 11 mL com o tampão M9 (KH₂PO₄ 22 mM; Na₂HPO₄ 42 mM; NaCl 85 mM; MgSO₄ 1 mM) e lavado 3 vezes com M9 sob centrifugação de 2600 g por 2 minutos. O volume do tubo com os ovos foi ajustado para 6 mL com M9 e o conteúdo transferido para uma placa de Petri de 60 mM e incubado durante 18 horas a 20 °C para que os ovos eclodam em larvas L1.

Após eclodirem dos ovos, os animais L1 foram contados. Para isso, realocamos os animais para um tubo de 15 mL e utilizamos uma ponteira de 200 µL com ponta cortada para pipetar alíquotas de 2 µL do meio contendo animais em uma lâmina para contagem ao microscópio. Nesta etapa é importante inverter o tubo gentilmente algumas vezes para certificar-se de que a concentração de animais é homogênea ao

longo do tubo. Além disso, durante a pipetagem, deve-se ter cuidado para que não haja perda de animais na ponteira. Para isso, pode-se realizar algumas pipetagens e devolver o conteúdo, para que alguns animais já estejam previamente aderidos à parede da ponteira, ou adicionar triton na concentração final de 0,1% ao meio, diminuindo aderência dos animais (DAVIS; SHARMA; LOW; BOAG, 2010). A partir da média de animais encontrados, estima-se a quantidade total de vermes. Em seguida, em cada placa de 100 mM contendo NGM e um filme de OP50, foram alocados no máximo 5.000 animais. As placas foram incubadas por aproximadamente 44 horas a 20 °C até atingirem o estágio L4. O tempo para os animais atingirem o estágio L4 pode variar dependendo das condições. Neste trabalho, o estágio L4 foi sempre confirmado pela marcação em forma de meia-lua na região da vulva. As placas foram lavadas com M9 a fim de retirar os vermes. Estes, foram então alocados em tubos de 15 mL e lavados 3 vezes com M9 sob centrifugação de 800 g por 2 minutos. Os vermes então foram contados e o volume ajustado com M9 para que a concentração de animais estivesse adequada para as análises ou para os tratamentos (Figura 4).

Figura 4. Cultivo dos animais. Os animais utilizados para os experimentos foram obtidos a partir de placas ricas em ovos e em hermafroditas grávidos. Esses animais foram sincronizados, restando apenas os ovos, que foram incubados durante 18h a 20 °C até que os animais eclodissem em estágio L1. Após, foram incubados 5000 animais L1 por placa de 100 mM durante 44h até que atingissem o estágio L4. Os animais L4 então seguiram diretamente para as análises ou para os tratamentos quando necessário.

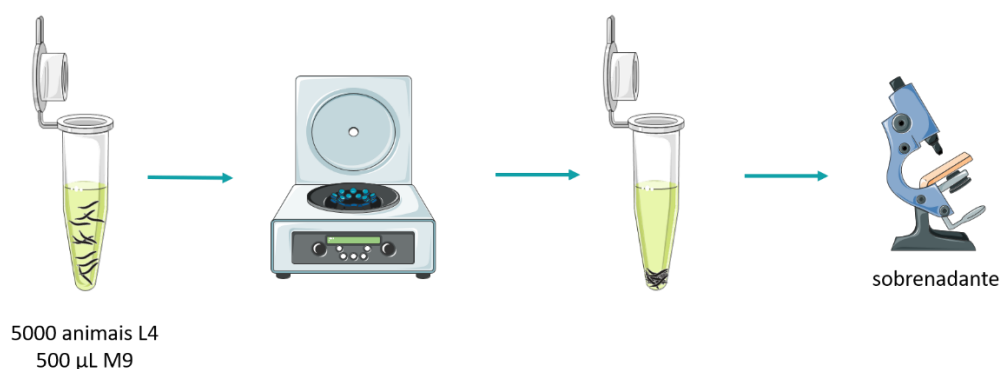


Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.2 TESTE SEDIMENTAÇÃO DOS VERMES

Foram acondicionados 5.000 vermes L4 em microtubos de 1,5 mL contendo 1,5 mL do meio M9. Os vermes foram sedimentados sob diferentes parâmetros de centrifugação: 150 g por 15 segundos, 600 g por 15 segundos, 2400 g por 15 segundos ou 5200 g por 2 minutos. A sedimentação dos vermes nos tubos foi analisada visualmente e o meio retirado até o nível de 100 ou 200 μL e observado ao microscópio (Figura 5).

Figura 5. Protocolo para sedimentação dos vermes. 5000 vermes foram submetidos a diferentes condições de centrifugação em tubos de 1,5 mL. Em seguida, a efetividade da sedimentação foi confirmada pela visualização da perda de animais no sobrenadante ao microscópio.



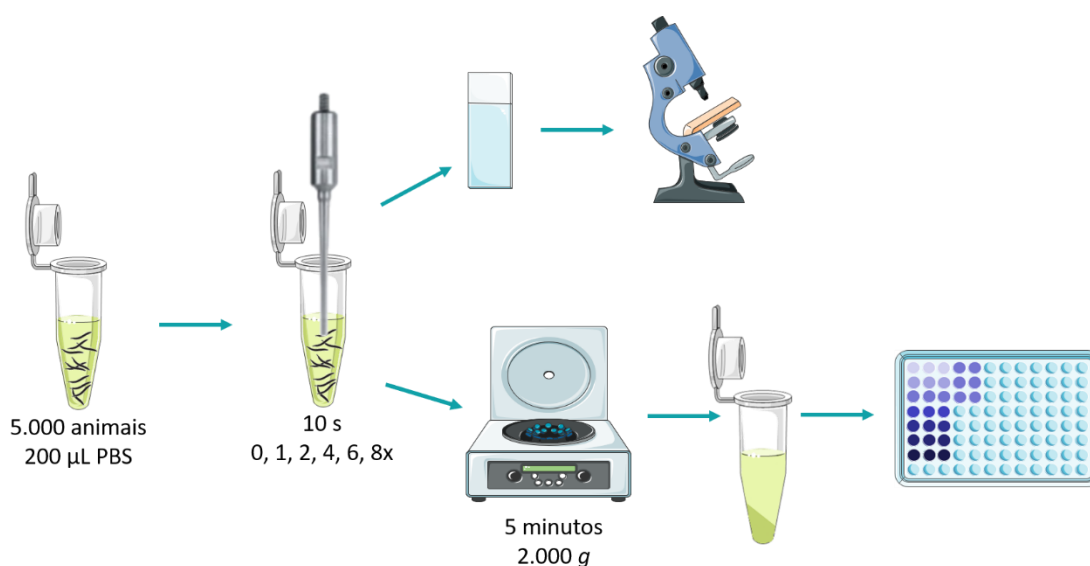
Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.3 TESTE DE PREPARO DE EXTRATO

Cada amostra de teste em meio neutro foi preparada com 5.000 vermes L4 e 200 μL de PBS em microtubos de 1,5 mL. As amostras passaram por 8 sonicações de 10 segundos com o *sonic dismembrator* D100 Fisher Scientific® (Waltham, Massachusetts) em intensidade 3. Com 0, 1, 2, 4, 6 e 8 sonicações foram retirados 10 μL da amostra para dosagem de proteína pelo método de Bradford. Em uma duplicata do tubo, que passou pelos mesmos procedimentos, retirou-se 10 μL para observar a integridade dos animais ao microscópio. Quando em meio ácido, foram utilizados 3.000 animais L4 adicionados a 300 μL de ácido perclórico 0,5 M. Cada amostra foi

submetida a 2, 4 ou 6 sonicações de 10 segundos e o rompimento dos vermes foi observado ao microscópio (Figura 6).

Figura 6. Protocolo para teste de preparo de extrato. Adicionou-se 200 μ L de PBS a 5000 animais que foram submetidos a 0, 1, 2, 4, 6 ou 8 sessões de sonicação de 10 segundos. Após cada um desses estágios de homogeneização, o preparo foi direcionado para visualização ao microscópio ou para centrifugação e em seguida para quantificação de proteína.



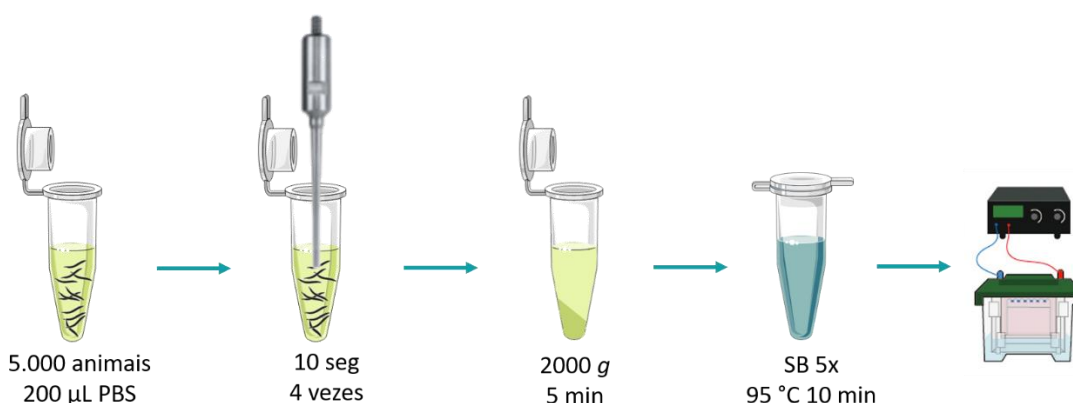
Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.4 WESTERN BLOTTING

Cada amostra foi preparada a partir de 5000 vermes homogeneizados por sonicação em tampão PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,47 mM), coquetel inibidor de protease e PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) 100 μ M. A amostra foi então centrifugada por 5 minutos a 2.000 g a 4 °C e uma alíquota do sobrenadante foi retirada para quantificação de proteína. Ao sobrenadante foi adicionado tampão da amostra *sample buffer* 5 vezes concentrado (Tris 329 mM pH 6,8; Glicerol 50%; β -mercaptoetanol 12,5%; SDS 10%; azul de bromofenol 1,45 mM), na proporção de 1:4 (tampão:amostra). O conteúdo foi sonicado e depois incubado em banho-maria por 10 minutos a 95 °C. As amostras foram armazenadas em -80 °C até o uso.

Utilizou-se eletroforese SDS-PAGE com géis de poliacrilamida 12% ou 15%, sendo adicionado 20 µg de amostra por poço. O sistema mini-Protean III BioRad® MiniProtean (Biorad, La Jolla) foi utilizado com géis de 1 mm e placas com pentes de 15 poços. A voltagem utilizada na eletroforese foi de 140 V fixos durante 90 minutos e posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose a 100 V durante 80 minutos sob refrigeração (Figura 7). As membranas foram bloqueadas em solução de TBST pH 7,5 (Tween20 0,1%; tris base 20 mM; NaCl 137 mM) com 5% de leite e incubadas *overnight* com anticorpos primários contra Prx ou Trx. Após incubação de 1 hora com anticorpo secundário contra coelho ligado à peroxidase (1:10000) e 3 lavagens com TBST, a membrana foi imersa em uma solução quimioluminescente (ácido P-cumárico 0,4 mM; luminol 2,5 mM; H₂O₂ 5,3 mM) e a luminescência captada pelo fotodocumentador Chemidoc MP (Bio-Rad®, La Jolla) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB)-UFSC. A presença de proteínas nas membranas foi comprovada pela coloração com ponceau-S.

Figura 7. Protocolo para preparo de Western Blotting. 200 µL de PBS foram adicionados a 5000 animais, que foram homogeneizados com 4 sonicações de 10 segundos. Em seguida, esse homogenato foi centrifugado e ao sobrenadante adicionado *sample buffer* 5 vezes concentrado. Esse preparo foi incubado em banho maria por 10 minutos e seguiu para os procedimentos da técnica de Western blot.



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.5 ENSAIO DE PERÓXIDOS COM XILENOL LARANJA

Os animais foram incubados por 3 horas a 20 °C sob rotação em tubos de 1,5 mL, sendo que 20, 100, 200 e 300 vermes foram incubados com 100 µM de peróxido

de cumeno (CHP) ou 100, 350 e 500 vermes incubados com 200 μM de CHP com o volume total de 500 μL por tubo, onde todos componentes foram diluídos em M9. Foi retirado uma alíquota de 7 μL de cada tubo nos tempos 0, 10, 30, 60, 120 e 180 minutos, sendo estas alocadas em placas de 96 poços e congeladas imediatamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

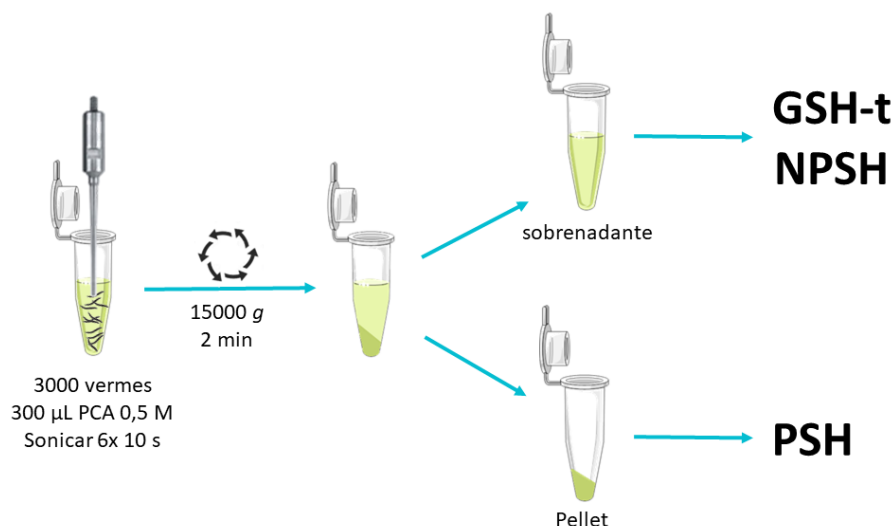
As amostras foram incubadas com xilenol laranja 0,25 mM, sulfato ferroso 0,25 mM e ácido perclórico 110 mM por 30 minutos em um volume final de 250 μL , de forma que o CHP presente na amostra oxide o Fe^{2+} em Fe^{3+} , que por sua vez se complexa com o xilenol laranja, sendo detectado espectrofotometricamente a 560 nm. Para estimar a concentração de peróxido, utilizou-se em cada placa uma curva padrão de 0 a 16 μM de CHP (GAY; GEBICKI, 2002) (Apêndice A).

4.6 NÍVEIS DE GLUTATIONA, TIÓIS PROTEICOS E TIÓIS NÃO PROTEICOS

4.6.1 Tratamentos e preparo das amostras

O método para medir GSH + GSSG (GSH total) foi adaptado do método criado por Tietze (1969) e então modificado pelo Laboratório de Defesas Celulares. Medimos os níveis de tióis em animais N2 L4 incubados com ou sem hidroperóxido de terc-butila (THP) 3 mM e 50 μL de OP50 a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou em gelo, com o intuito de diminuir o metabolismo dos vermes, em um volume de 500 μL em tubos de 1,5 mL sob agitação. Para o preparo da amostra, foram utilizados 3.000 vermes homogeneizados em 300 μL de ácido perclórico 0,5 M e sonicados 6 vezes por 10 segundos em tubos de 1,5 mL. O número de sonicações precisou ser aumentada pois os vermes se mostraram mais resistentes em meio ácido. Durante a preparação, as amostras foram mantidas em gelo e as sessões de sonicação foram intercaladas entre os tubos a fim de evitar o aquecimento. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a $15.000\text{ }g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi separado e seguiu para as dosagens de GSH total e NPSH e o pellet para PSH (Figura 8).

Figura 8. Fluxograma do preparo de amostra para avaliação de níveis de tióis. Os vermes foram rompidos mediante 6 sonicações de 10 segundos em meio ácido. A porção proteica é sedimentada e segue para avaliação de níveis de tióis proteicos (PSH), já o sobrenadante é reservado para mensuração de tióis não proteicos (NPSH) e glutatona total (GSH-t).



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.6.2 Avaliação dos níveis de tióis proteicos (PSH)

O pellet derivado da preparação descrita em 4.6.1 foi lavado 1 vez com 1 mL de PCA 0,5 M, sonicado 1 vez por 5 segundos e centrifugado a 15.000 g por 2 minutos a 4 °C, sendo descartado o sobrenadante. Foi então adicionado 300 µL de Tris/HCl 1 M pH 7,4; SDS 1% e sonicado 1 vez por 5 segundos. Deste preparo, retirou-se uma alíquota de 20 µL para dosagem de proteína pelo método de Peterson e 100 µL utilizado para incubação em cada tubo de 1,5 mL por 30 minutos sob agitação a temperatura ambiente com Tris/HCl 1 M pH 7,4; SDS 1%; DTNB 5 mM sem (amostra teste) ou com (branco) NEM 130 mM, com o volume total de cada tubo de 300 µL. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 15.000 g por 2 minutos. A absorbância de 250 µL do conteúdo foi lida em 412 nm, em placa de 96 poços. A curva padrão foi sempre realizada a cada leitura, contendo GSH de 0 a 100 µM (Figura 9) (Apêndice A).

em sequência foi centrifugado a 15.000 g por 1 minuto a 4 °C. Este preparo seguiu para as medições dos níveis de GSH-t e NPSH (Figura 10) (Apêndice A).

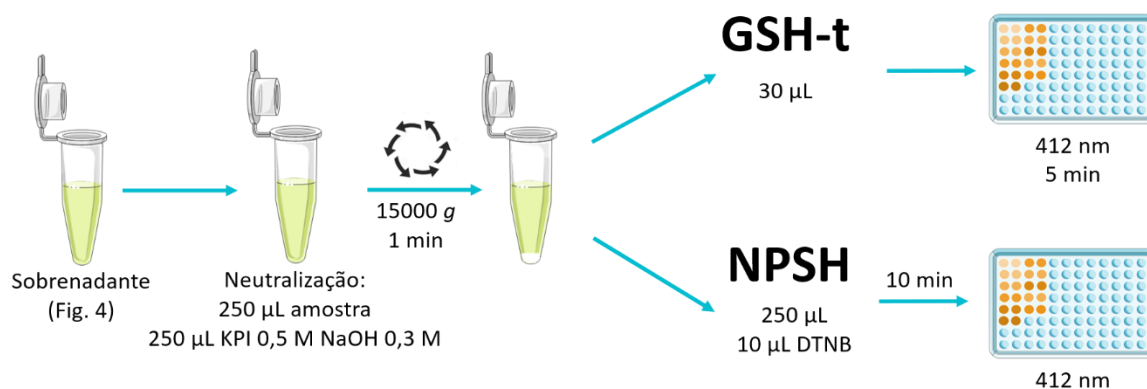
4.6.3.1 Glutaciona total

A mensuração da GSH total foi feita de forma enzimática contendo tampão potássio e fosfato 100 mM, DTNB 0,09 mM, GR 0,2 U/mL e NADPH 0,2 mM. 30 μ L de amostra foram adicionados no ensaio, obtendo-se um volume final de 260 μ L. A formação de TNB foi feita em placa de 96 poços em 412 nm por 5 minutos. A curva padrão foi sempre realizada a cada leitura, contendo GSH de 0 a 1,5 μ M (Figura 10) (Apêndice A).

4.6.3.2 Tióis não proteicos totais

A detecção de NPSH foi feita a partir de 250 μ L de sobrenadante como preparado acima e adicionado 10 μ L de DTNB na concentração final de 5 mM, sendo incubados em placa de 96 poços por 10 minutos. A formação de TNB foi mensurada em 260 μ L do conteúdo em 412 nm. A curva padrão foi sempre realizada a cada leitura, contendo GSH de 0 a 100 μ M (Figura 10) (Apêndice A).

Figura 10. Fluxograma da avaliação dos níveis de tióis não proteicos. O sobrenadante resultante do preparo representado na figura 4 teve seu pH neutralizado e utilizou-se 30 μ L para as análises de glutaciona total (GSH-t) e 250 μ L para tióis não proteicos (NPSH). Ambas análises medem a formação de TNB a 412 nm.



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

4.7 DOSAGEM DE PROTEÍNA

4.7.1 Método de Peterson

O método de Peterson utilizado é uma adaptação do método de Lowry (PETERSON, 1977). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços a partir de 10 μL de amostra em duplicata seguido da adição de solução cujas concentrações no ensaio foram de sulfato de cobre 0,01%, tartarato de potássio 0,02%, carbonato de potássio 1%, SDS 1% e NaOH 0,08 N. A placa foi incubada ao abrigo da luz por 10 minutos e, em sequência, adicionado Folin na concentração final de 0,08 N. A placa foi incubada novamente ao abrigo da luz por 30 minutos e a absorbância mensurada espectrofotometricamente a 620 nm. Foi utilizado como referência para a quantidade de proteína uma curva padrão contendo albumina de soro bovino de 0 a 32 mg por poço. Esse método foi utilizado para amostras com potenciais interferentes ao método de Bradford, visto que a metodologia de Peterson elimina a influência de diversas substâncias.

4.7.2 Método de Bradford

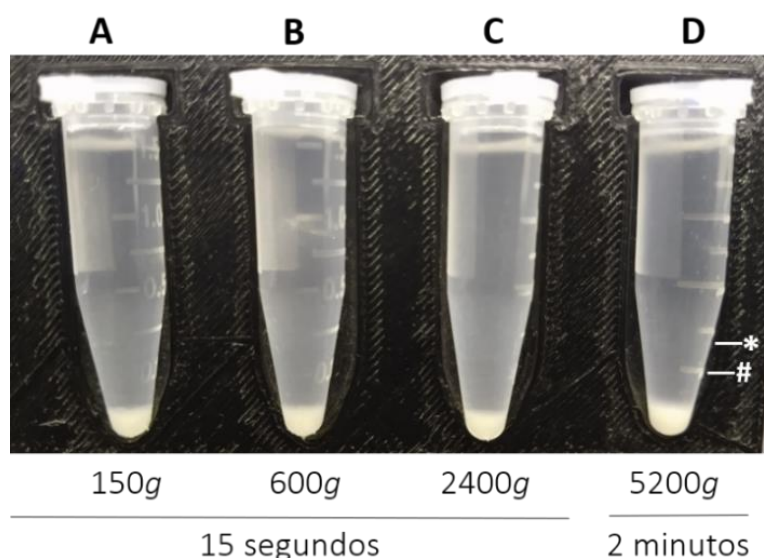
Foram incubados 5 μL de amostra em duplicata com comassie blue G-250 160 μM , etanol 770 mM e ácido fosfórico 1,48 M em um volume final de 275 μL durante 10 minutos em placa de 96 poços. A absorbância do ensaio foi medida em 595 nm juntamente com uma curva padrão de albumina de soro bovino de 0 a 5 μg por poço (BRADFORD, 1976). Apesar de mais simples de ser executado em relação ao método de Peterson, o método de Bradford possui diversos interferentes (BONJOCH; TAMAYO, 2003). Portanto, essa metodologia foi utilizada quando a amostra não continha possíveis interferentes ao método.

5 RESULTADOS

Em relação à manipulação dos animais, visando reduzir o estresse gerado pelas centrifugações intensas durante as lavagens após as incubações com tratamentos, buscamos a intensidade mais branda de centrifugação em que os animais ainda fossem sedimentados com eficiência. Sabendo-se que em tubos de 15 mL a velocidade ideal é de 800 *g* (KOHL *et al.*, 2018), nos focamos em estabelecer a velocidade para microtubos de 1,5 mL. Embora visualmente a sedimentação em todos os tubos foram similares (Figura 11), ao retirarmos os sobrenadantes até o volume aproximado de 100 μ L, houve perda de animais nas centrifugações de 150 *g* (Figura 11A) e 600 *g* (Figura 11B) por 15 segundos em minicentrífuga, sendo essa perda em média de 38 e 5 animais, respectivamente. Dessa forma, padronizou-se para que restem aproximadamente 200 μ L de conteúdo no tubo após as lavagens sob 150 *g* por 15 segundos em mini centrífuga, minimizando as chances de perda de animais.

A centrifugação também foi eficiente nas velocidades de 2400 *g* em mini centrífuga (Figura 11C) e 5000 *g* (Figura 11D) por 15 e 120 segundos, respectivamente. Entretanto, é importante destacar que centrifugações que visem o preparo de amostras, onde é preciso que reste ainda menos de 200 μ L de pellet, a velocidade ideal deve ser de 2400 *g* por 15 segundos para volumes de no mínimo 100 μ L.

Figura 11. Sedimentação de vermes L4 em microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram preenchidos até seu o volume máximo com meio M9, contendo cerca de 5000 animais. Foram centrifugados em mini centrífuga por (A) 150 g por 15 segundos, (B) 600 g por 15 segundos, (C) 2400 g por 15 segundos ou em centrífuga convencional por (D) 5000 g por 120 segundos. Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e a presença de vermes foi analisada ao microscópio. # e * indicam o volume aproximado de 100 μ L e 200 μ L, respectivamente.

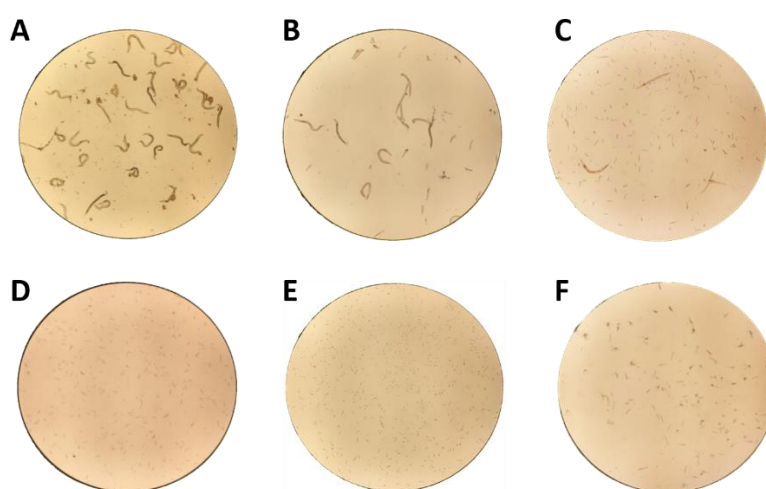


De forma a otimizar o tempo de preparo e a qualidade das amostras, investigamos o número ideal de sonicações que precisam ser aplicadas de forma a romper todos os animais e se extrair o máximo possível do conteúdo celular. Partindo de 5000 animais L4 íntegros (Figura 12A) testamos a preparação de amostra por sonicação, fazendo amostragens e as analisando ao longo do preparo. Observamos que com uma única sonicação muitos animais não haviam sido rompidos (Figura 12B). Entretanto, com duas sessões o rompimento dos vermes foi quase total (Figura 12C) e a partir de quatro sessões no sonicador os animais se encontravam completamente rompidos (Figura 12D-F).

Em paralelo à inspeção visual, a quantidade de proteínas foi analisada no sobrenadante após centrifugação de 15.000 g, por 120 segundos. Como pode ser visto na Figura 8G, há uma tendência de valor máximo a partir de 4 sessões de sonicação. Com base na inspeção visual e dosagem de proteínas, recomenda-se 4 sessões de sonicação de 10 segundos. Da mesma forma, quando comparamos os

valores absolutos encontrados com 4 e 8 sonicações, podemos observar que a concentração de proteína é similar (tabela 1).

Figura 12. Extração de proteína após sonicações de 10 segundos. Utilizou-se 5.000 animais (A) sem sonicar ou com número de sonicações de (B) 1, (C) 2, (D) 4, (E) 6, (F) 8. (G) Porcentagem de proteína em relação ao valor máximo no sobrenadante após centrifugação à 15.000 g, por 120 segundos. A abscissa representa o número de sessões de sonicação. As imagens microscópicas com 40 vezes de aumento foram obtidas com celular.



G Extração de Proteína

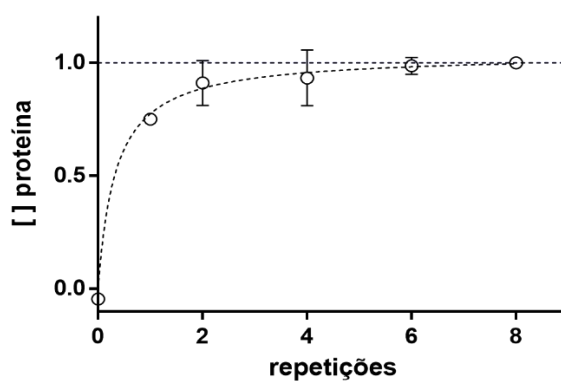


Tabela 1. Concentração de proteína de amostras sonicadas. Relação entre a concentração total ou por animal de proteína e resultante de 5000 animais adicionados a 200 μ L de PBS sob 4 ou 8 sessões de sonicação de 10 segundos seguido de centrifugação de 15.000 g por 120 segundos. Valores referentes ao método de Peterson. Valores com \pm desvio padrão.

<i>Concentração total de proteína</i>	
4 sonicações	2,11 \pm 0,66 mg/mL
8 sonicações	2,22 \pm 0,58 mg/mL
<i>Concentração de proteína por animal</i>	
4 sonicações	105,55 \pm 33,28 μ g/mL
8 sonicações	111,04 \pm 28,97 μ g/mL

Partindo do princípio de que camundongos e *C. elegans* possuem certo grau de homologia entre suas proteínas, investigamos a possibilidade dos anticorpos disponíveis e utilizados em nosso laboratório contra Prx e Trx serem compatíveis com as respectivas proteínas homólogas em *C. elegans*. Através de uma triagem inicial, utilizando apenas a cepa selvagem N2, percebemos que os anticorpos detectaram proteínas em diferentes pesos moleculares, de forma não específica. Entretanto, algumas das bandas marcadas potencialmente poderiam se tratar da proteína de interesse, indicados pelos asteriscos (Figura 13A, B). Tendo isso em vista, repetimos os testes com os anticorpos em questão utilizando a cepa N2 e também as cepas VZ130 e VE01, mutantes para Trx1/2 e Prx, respectivamente. Todavia, as bandas continuaram aparecendo tanto na cepa selvagem quanto na mutante, aparentando não se tratar das proteínas de interesse (Figura 13C). Complementar a estes resultados, também testamos a incubação apenas com o anticorpo secundário e não houve detecção alguma de sinal, mostrando que todas as bandas detectadas são devido a ligação do anticorpo primário.

Figura 13. Testagem de anticorpos. Amostras da cepa selvagem (N2) foram testadas por Western blot utilizando anticorpos contra (A) tiorredoxinas (Trx), nas isoformas citosólica (Trx1) e mitocondrial (Trx2). Espera-se obter uma banda em torno de 13 KDa para Trx1 ou 15 KDa para Trx2. Da mesma forma, amostras de animais selvagens (N2) foram testados para as peroxirredoxinas (Prx) citosólicas (Prx2 e Prx6), mitocondrial (Prx3) e Prx4. Espera-se obter uma banda em torno de

25 KDa para Prx3 e 6 ou de 22 KDa para Prx2. Observa-se que o anticorpo contra Trx2 detecta uma proteína em torno de 12 KDa, enquanto a Prx6 aparece em ~26 KDa (C). Para testar a especificidade do anticorpo, mutantes para a Trx2 (VZ21) e Prx2 (VE01) foram testados em paralelo com amostras de N2. Numerações de 1 a 15 indicam anticorpos ou diluições diferentes, especificadas na Tabela 2. Asteriscos indicam os anticorpos e diluições selecionados para os testes com as cepas mutantes em C.

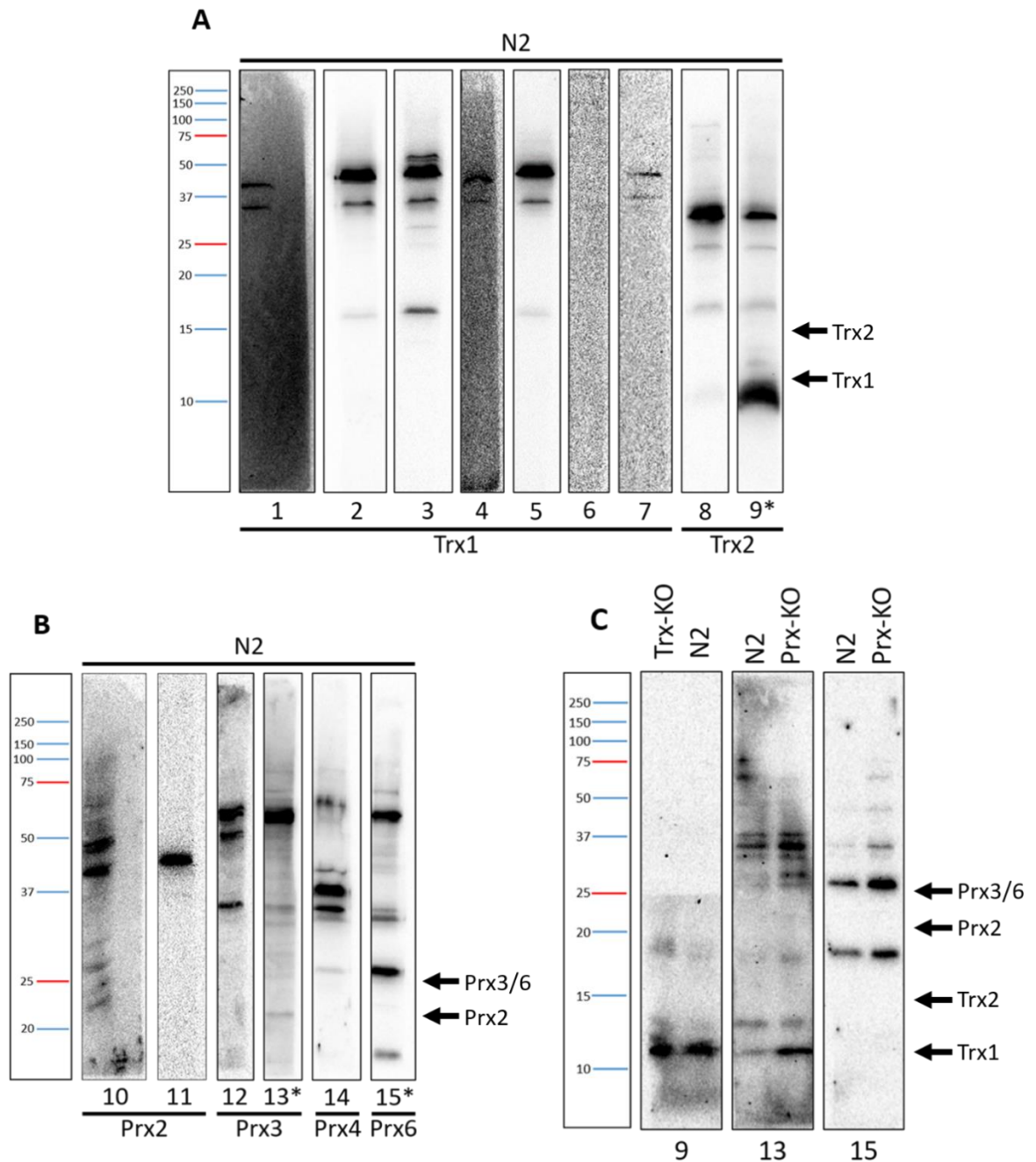


Tabela 2. Anticorpos utilizados nos testes de Western blot. Numerações do anticorpo referentes às indicadas na Figura 13 seguido de suas especificações de proteína alvo, diluição, fabricante e código do produto. Informações não disponíveis indicadas por “_”.

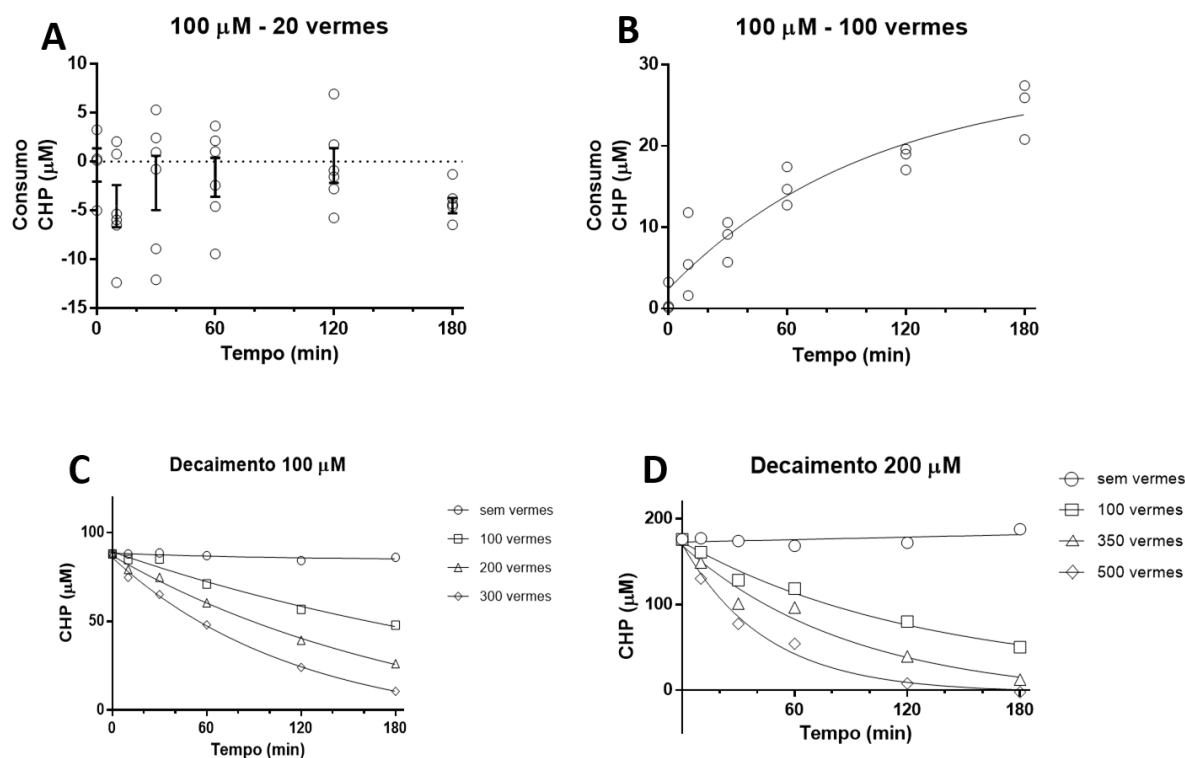
Anticorpo	Proteína	Diluição	Fabricante	Código
1	Trx1	1:1000	Cell Signal	C63C6
2	Trx1	1:500	_	_
3	Trx1	1:1000	_	_
4	Trx1	1:3000	Cell Signal	C63C6
5	Trx1	1:3000	Santa Cruz	SC20146
6	Trx1	1:10000	_	_
7	Trx1	1:3000	Cell Signal	C63C6
8	Trx2	_	_	_
9	Trx2	1:1000	Santa Cruz	SC50336
10	Prx2	1:10000	_	_
11	Prx2	1:1000	_	_
12	Prx3	1:10000	Abcam	AB50300
13	Prx3	1:3000	_	_
14	Prx4	1:10000	Millipore	07-612
15	Prx6	1:4000	Santa Cruz	SC134478

Com intenção de encontrar uma condição experimental em que fosse possível detectar a degradação de peróxido do meio de incubação dos vermes através do FOX, avaliamos os níveis de diferentes concentrações de CHP e variadas quantidades de vermes ao longo de 180 minutos. Inicialmente, avaliamos a eficácia na degradação do hidroperóxido do meio com 20 ou 100 vermes por tubo, com 100 μ M de CHP. Observamos que 20 vermes não são capazes de degradar suficiente CHP para ser quantificado pelo método (Figura 14A). Porém, com 100 vermes foi possível verificar um consumo consistente e progressivo ao longo dos 180 minutos analisados. Cerca de 25% do peróxido foi eliminado ao fim da incubação (Figura 14B). Após esta abordagem inicial, testamos diferentes quantidades de animais em concentrações fixas de peróxido. Assim, foram incubados 100, 200 e 300 vermes em 100 μ M de CHP (Figura 14C) ou 100, 350 e 500 vermes em 200 μ M (Figura 14D), analisando a sua

degradação ao longo do tempo. Com isso, observamos que, além de ser progressivo ao longo do tempo, o consumo do CHP é proporcional ao número de animais (Figura 14C e D). Ainda, 500 animais foram capazes de degradar totalmente 200 μM de peróxido em 180 minutos (Figura 14D).

Com estes dados, podemos verificar que o consumo do CHP pode ser detectado e quantificado já com um número de animais relativamente pequeno e fácil de ser obtido em cultivo.

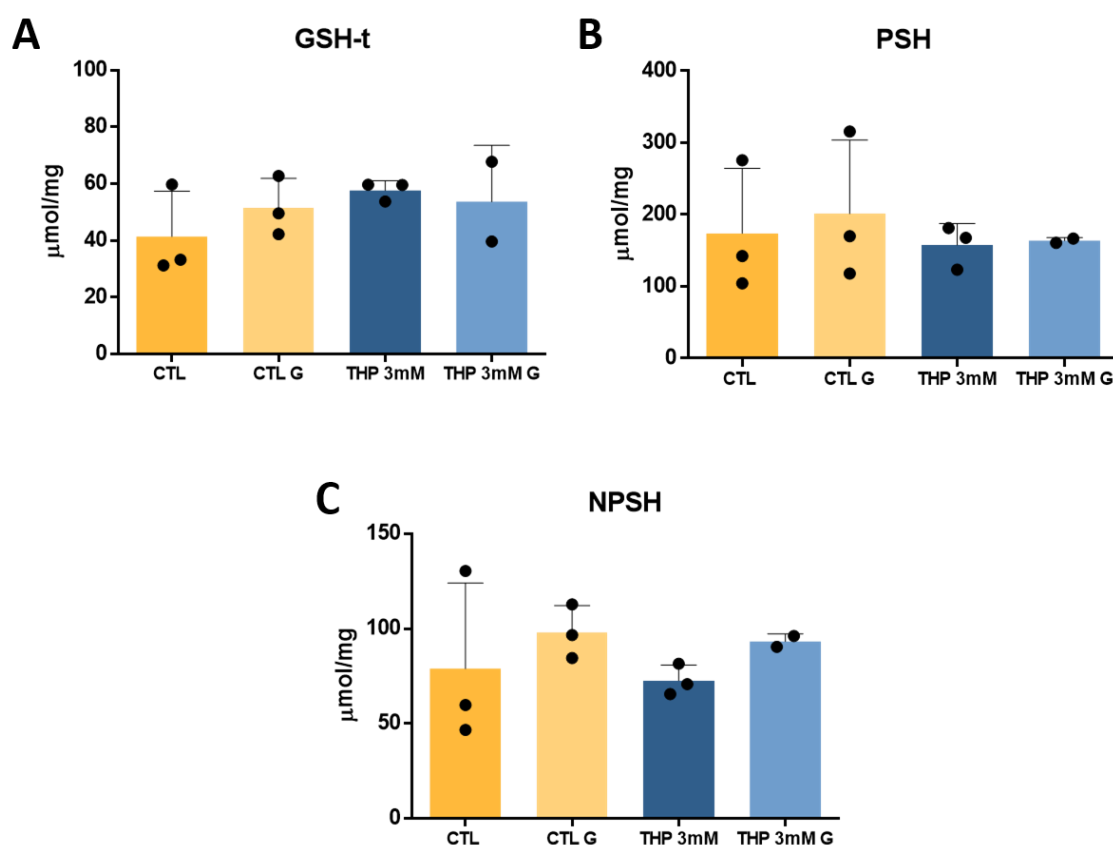
Figura 14. Decaimento de hidroperóxido de cumeno (CHP). Consumo de CHP 100 μM com (A) 20 ou (B) 100 animais. Degradação de CHP (C) 100 μM ou (D) 200 μM com diferentes quantidades de vermes.



Buscando padronizar para amostras de *C. elegans* o método já utilizado para outras amostras biológicas, analisamos os níveis de GSH, PSH e NPSH com e sem o tratamento de THP 3 mM. Com este tratamento, esperávamos encontrar uma diminuição nos níveis de glutathiona, assim como ocorre com células humanas mediante tratamento com THP (OCHI, 1993). O método foi capaz de detectar os grupos tióis nas três frações de amostras, porém, nem o tratamento com THP por si nem o associado à diminuição do metabolismo induzido pelo gelo foi capaz de

modificar significativamente estes parâmetros (Figura 15). Em um panorama geral, encontramos que os grupamentos tióis estão em maior abundância nas proteínas, com cerca de 170 μmol (figura 15B), seguido pelos tióis não proteicos. Em teoria, os níveis de NPSH e GSH-t deveriam ser próximos, entretanto, os níveis de NPSH estão mais elevados (Figura 15C) enquanto a GSH-t está em menor quantidade (Figura 15A).

Figura 15. Níveis de tióis em *C. elegans*. (A) Glutationa total (GSH-t), (B) tióis proteicos (PSH) e (C) tióis não proteicos (NPSH). Um grupo foi de animais controle, não tratados (CTL), e outro de animais tratados com hidróperóxido de terc-butila 3 mM (THP). Ambos foram incubados à 20°C, por 180 minutos. Uma parte dos animais permaneceu em gelo picado, para interromper as reações “G”.



6 DISCUSSÃO

Em um contexto de implementação do *C. elegans* como modelo de pesquisa, nos deparamos com diferentes metodologias para o rompimento do verme e preparo de amostra (JEONG; LEE; LEE, 2018). Portanto, decidimos padronizar um método que se adequasse à infraestrutura disponível no laboratório. Além disso, verificamos que, em sua maioria, os trabalhos com *C. elegans* sobretudo exploram a utilização das diversas cepas mutantes disponíveis (CARRANZA *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2010). Entretanto, tínhamos o interesse de investigar aspectos bioquímicos com estas linhagens.

Extração de proteínas. Conseguimos romper e extrair o conteúdo proteico dos vermes de forma eficiente através de sessões de sonicação. Com apenas 4 repetições já foi possível obter o melhor resultado (Figura 12). Tendo em vista que a cutícula que envolve e protege o *C. elegans* é bastante resistente, outros métodos já estabelecidos apresentam as mesmas características, necessitando repetidos insultos para uma extração bem sucedida, tais como congelamento e descongelamento, banho maria, maceração com nitrogênio líquido ou homogeneização com pistilo (JEONG; LEE; LEE, 2018). Pudemos constatar também que a cutícula é mais resistente em meio ácido, cujo uso neste trabalho foi no preparo da amostra para mensuração de tióis. Nesse contexto, precisamos submeter os vermes a 6 sessões de sonicação. Baseado na nossa experiência, sugerimos que, primeiramente, os vermes sejam rompidos em pH neutro e depois as amostras sejam acidificadas.

Western Blot. Independentemente dos anticorpos aqui analisados pelo método de Western blot aparentemente não terem sido capazes de se ligarem especificamente às proteínas homólogas em *C. elegans* (Figura 13), isso não descarta a possibilidade da existência de ligação cruzada com outros anticorpos de mamíferos, como já foi visto anteriormente (ALVES, 2015). Provavelmente, no caso dos anticorpos aqui testados, o epítipo específico de ligação do anticorpo se tratava de uma região não homóloga entre mamíferos e os nematódeos (PILLAI-KASTOORI *et al.*, 2020). Entretanto, os animais mutantes, apesar de apresentarem perda funcional referentes às suas mutações, ainda possuem parte da proteína. Isso levanta a possibilidade de que a parte remanescente da proteína seja correspondente ao epítipo específico do

anticorpo, fazendo com que as bandas no Western blot sejam marcadas tanto no animal selvagem quanto no mutante.

Degradação de peróxido. Neste trabalho, pudemos constatar que o método original do FOX que detecta peróxidos foi eficiente para detecção de CHP no meio de incubação dos vermes, assim como sua taxa de degradação ao longo do tempo (Figura 14). Entretanto, novas análises são necessárias para comprovar a eficácia deste protocolo. No nosso caso, o meio de incubação M9 tem pouca quantidade de matéria orgânica praticamente eliminando as interferências que acontecem com amostras biológicas mais complexas, como extrato bruto do tecido do verme. Entretanto, estes resultados não comprovam que os vermes estejam realmente eliminando o peróxido, apenas que ele não está mais presente no meio de incubação. Esta resposta pode ser devida apenas à internalização do peróxido.

Determinação de tióis. Mesmo ambas sendo adaptações da mesma metodologia original proposta por TIETZE (1969), em suas minúcias, nosso método para quantificação de glutatona total se diferencia do desenvolvido anteriormente (CAITO; ASCHNER, 2015). A principal diferença está no número de animais, onde conseguimos realizar a detecção com apenas 3.000 vermes, enquanto o outro método realizou com cerca de 20.000 animais, representando uma diminuição de quase 7 vezes. Esta redução dos animais resulta em menos trabalho em termos de cultivo, principalmente quando se utiliza várias cepas, já que esse total de vermes pode ser obtido em uma única placa de 100 mm de diâmetro. Outro aspecto que se diferencia é a concentração de reagentes no ensaio, em que Caito e Aschner (2015) utilizam ~30 vezes mais DTNB e 5 vezes mais GR. Neste outro método, concentrações de GSH total em *C. elegans* em animais N2 controle foram encontradas em torno de 23 nmol/mg proteína em adultos jovens e 8 nmol/mg proteína em fase L4 (CAITO; ASCHNER, 2015; GUHA *et al.*, 2019; RUSZKIEWICZ *et al.*, 2018). O nosso método detectou as concentrações de GSH total por volta de 40 μ mol/mg em animais N2 controle (Figura 15A). Isto indica a necessidade de maiores investigações em relação à confiabilidade deste método que, por conta da situação de pandemia, não foi possível realizarmos.

Em nossa metodologia, o mesmo preparo é utilizado para as análises de GSH total e NPSH. De acordo com os nossos dados (Figura 15 A e C), os níveis de NPSH

são cerca de 50% maiores no caso do grupo controle, padrão este também observado em bivalves (TREVISAN, 2010), indicando que provavelmente o *C. elegans* possui outros tióis de baixo peso molecular além da própria GSH. Essa hipótese é embasada por medidas de cromatografia líquida de alta eficiência e de espectrometria de massa, que encontraram em amostras de *C. elegans*, além da própria GSH, também cisteína, cisteína-glicina, glutamato-cisteína e ainda dois outros tióis de baixo peso molecular desconhecidos (ASAMOTO *et al.*, 2007).

Apesar de em testes preliminares em nosso grupo com este mesmo tratamento com 3 mM de THP terem demonstrado interferir na sobrevivência dos animais nessas mesmas condições experimentais, sendo referente à concentração letal de 50%, não pudemos observar efeitos nos níveis de tióis (Figura 15). É possível que estes animais possam ter uma resposta a longo prazo, não observada nesta análise, que foi imediatamente após o tratamento. Além disso, é possível que os níveis totais dos tióis não tenham sido modificados, mas uma mudança na razão GSH/GSSG, não é descartada, sendo necessárias mais análises para elucidar este aspecto. Ainda, o THP, assim como o H_2O_2 , possui um pKa alto e, portanto, reage mais rapidamente com moléculas de pKa mais baixo, o que não é o caso da maioria das proteínas e peptídeos com grupamentos tióis. Neste caso, pode ser que o tratamento com THP tenha como alvo outras moléculas, não diretamente os níveis de tióis (PUBCHEM, [s. d.]; WINTERBOURN, 2013).

***C. elegans* como modelo na UFSC.** O *C. elegans* se mostrou um modelo bastante prático para a utilização na pesquisa, principalmente em relação ao tempo. Caso sejam cultivados em diferentes estágios de desenvolvimento concomitantemente, é possível realizar todas as análises referentes ao parâmetro desejado em apenas uma semana. Além disso, pode-se acompanhar o ciclo de vida do animal em menos de um mês. Ainda há a vantagem de ser um animal de fácil manipulação e de facilmente se conseguir um grande número de animais para os experimentos.

Apesar de suas muitas vantagens, a utilização deste modelo de pesquisa também tem suas dificuldades. O cultivo do nematódeo em placa de Petri, apesar de simples, é um sistema sensível. Por conta do pré-cultivo com bactérias nas placas, é comum que haja contaminações e perda de material. Além disso, pudemos constatar que a cultura é atrativa para ácaros, que também a inviabilizam. Ainda, por conta de seu rápido desenvolvimento, durante os experimentos, muitas vezes os animais

requerem procedimentos diários. Também há dificuldade quanto a ausência de interferentes durante os tratamentos por conta da presença constante de bactéria nas placas.

Atualmente, na Universidade Federal de Santa Catarina, o Laboratório de Defesas Celulares, em parceria ao Laboratório Experimental em Neuropatologias, segue com pesquisas utilizando o *C. elegans*, com uma doutoranda do Programa de Pós-graduação em Neurociências. Além desta aluna, já trabalharam com o modelo três alunos de graduação, dois pós-doutorandos e uma aluna de graduação em estágio de verão. Além da pesquisa, o *C. elegans* já foi utilizado para minicursos de divulgação do modelo de pesquisa disponibilizados no curso de Verão em Neurociências UFSC 2020 e no Simpósio Integrado do PPG em Neurociências 2019, sendo que nesse último foram apresentados os resultados obtidos com as pesquisas.

Em uma visão geral, o *C. elegans* se mostra viável e vantajoso como modelo de pesquisa no ambiente em que foi instalado no Laboratório de Defesas Celulares. Entretanto, em um grupo de pesquisa em que uma das vertentes principais de pesquisa é a bioquímica, ainda é preciso adaptar mais técnicas para este modelo, visando expandir as possibilidades experimentais, assim como a viabilidade da interlocução entre experimentos com *C. elegans* e mamíferos.

7 CONCLUSÃO

Com este trabalho pudemos estabelecer um procedimento menos agressivo para as centrifugações necessárias durante os experimentos, assim como uma forma eficaz e otimizada de extração de proteínas do *C. elegans*. Os anticorpos aqui testados não foram específicos às amostras do verme, o que não descarta a possibilidade de que outros anticorpos sejam apropriados.

A detecção dos níveis de CHP no meio de incubação dos animais, utilizando o ensaio de oxidação férrica e xilenol laranja, se mostrou eficiente a partir de 100 μM e 100 vermes. Existe a disponibilidade de se usar diferentes parâmetros de forma eficiente e adaptável, de acordo com as necessidades de pesquisa.

O método aqui proposto para a mensuração dos níveis de tióis nas amostras de *C. elegans* foi capaz de detectar a presença destas moléculas nas amostras. Este método se mostrou ser de fácil execução, sendo necessário poucos animais para as análises, permitindo assim que sejam estudados vários grupos simultaneamente. Além disso, é uma técnica que permite a leitura de PSH, NPSH, e GSH-t em uma mesma amostra, e de maneira rápida, diminuindo assim interferências experimentais relativas à modificação das amostras.

Para trabalhos futuros nesta temática, é relevante a verificação da viabilidade de mensuração dos níveis de peróxido nas amostras biológicas de *C. elegans*, assim como a implementação de novos métodos para análise de parâmetros de saúde e do estado oxidativo dos animais.

8 REFERÊNCIAS

ALVES, Viviane. Reactivity of vertebrate-directed phospho-eEF2 antibody against the *Caenorhabditis elegans* orthologue phospho-EEF-2. **F1000Research**, [S.L.], v. 4, p. 902-908, 25 set. 2015. F1000 Research Ltd. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.7127.1>.

ASAMOTO, Hiromichi; ICHIBANGASE, Tomoko; SAIMARU, Hiroshi; UCHIKURA, Kazuo; IMAI, Kazuhiro. Existence of low-molecular-weight thiols in *Caenorhabditis elegans* demonstrated by HPLC-fluorescence detection utilizing 7-chloro-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonamide. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 10, p. 999–1004, out. 2007. <https://doi.org/10.1002/bmc.814>.

ASPERNIG, Helena; HEIMBUCHER, Thomas; QI, Wenjing; GANGURDE, Dipak; CURIC, Sedric; YAN, Yijian; DONNER VON GROMOFF, Erika; BAUMEISTER, Ralf; THIEN, Antje. Mitochondrial Perturbations Couple mTORC2 to Autophagy in *C. elegans*. **Cell Reports**, v. 29, n. 6, p. 1399-1409.e5, nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.072>.

BAKER, Margaret A.; CERNIGLIA, George J.; ZAMAN, Aziza. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. **Analytical Biochemistry**, v. 190, n. 2, p. 360–365, nov. 1990. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90208-Q](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90208-Q).

BONJOCH, Nuria Pedrol; TAMAYO, Pilar Ramos. Protein Content Quantification by Bradford Method. *In*: REIGOSA ROGER, Manuel J. (org.). **Handbook of Plant Ecophysiology Techniques**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 283–295. DOI 10.1007/0-306-48057-3_19. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/0-306-48057-3_19. Acesso em: 23 maio 2021.

BOU, Ricard; CODONY, Rafael; TRES, Alba; DECKER, Eric A.; GUARDIOLA, Francesc. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation–xylenol orange method: A review of the factors that influence the method's performance. **Analytical Biochemistry**, v. 377, n. 1, p. 1–15, jun. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.02.029>.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRENNER, S. The Genetics of CAENORHABDITIS ELEGANS. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71–94, maio 1974. .

BRUNDU, Serena; NENCIONI, Lucia; CELESTINO, Ignacio; COLUCCIO, Paolo; PALAMARA, Anna Teresa; MAGNANI, Mauro; FRATERNALE, Alessandra. Validation of a Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Analysis of Cysteine and Reduced Glutathione in Mouse Organs.

Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2016, p. 1–7, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1746985>.

BYERLY, L.; CASSADA, R.C.; RUSSELL, R.L. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**, v. 51, n. 1, p. 23–33, jul. 1976. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90119-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90119-6).

CAITO, Samuel W.; ASCHNER, Michael. Quantification of Glutathione in *Caenorhabditis elegans*. **Current protocols in toxicology / editorial board, Mahin D. Maines (editor-in-chief) ... [et al.]**, v. 64, n. 618, p. 6.18.1-6.18.6, maio 2015. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0618s64>.

CARRANZA, Andrea del Valle; SARAGUSTI, Alejandra; CHIABRANDO, Gustavo Alberto; CARRARI, Fernando; ASIS, Ramón. Effects of chlorogenic acid on thermal stress tolerance in *C. elegans* via HIF-1, HSF-1 and autophagy. **Phytomedicine**, v. 66, p. 153132, jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153132>.

CORSI, Ann K.; WIGHTMAN, Bruce; CHALFIE, Martin. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387–407, jun. 2015. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>.

CROMBIE, Timothy A.; TANG, Lanlan; CHOE, Keith P.; JULIAN, David. Inhibition of the oxidative stress response by heat stress in *Caenorhabditis elegans*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 219, n. 14, p. 2201–2211, 15 jul. 2016. <https://doi.org/10.1242/jeb.135327>.

DALLE-DONNE, Isabella; ROSSI, Ranieri; GIUSTARINI, Daniela; COLOMBO, Roberto; MILZANI, Aldo. S-glutathionylation in protein redox regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 6, p. 883–898, set. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.014>.

DAVIS, Gregory M.; SHARMA, Madhu; LOW, Lloyd; BOAG, Peter R.. **Triton X decreases adherence of C. elegans to pipette tips in liquid medium**. 2010. Disponível em: <http://dev.wormbook.org/wbg/articles/volume-18-number-2/triton-x-decreases-adherence-of-c-elegans-to-pipette-tips-in-liquid-medium/>. Acesso em: 22 maio 2021.

DELUCIA, A J; MUSTAFA, M G; HUSSAIN, M Z; CROSS, C E. Ozone interaction with rodent lung. III. Oxidation of reduced glutathione and formation of mixed disulfides between protein and nonprotein sulfhydryls. **Journal of Clinical Investigation**, v. 55, n. 4, p. 794–802, 1 abr. 1975. <https://doi.org/10.1172/JCI107990>.

DOKE, Sonali K.; DHAWALE, Shashikant C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ**, v. 23, n. 3, p. 223–229, jul. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>.

ELLMAN, George L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, maio 1959. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).

FERGUSON, Gavin Douglas; BRIDGE, Wallace John. The glutathione system and the related thiol network in *Caenorhabditis elegans*. **Redox Biology**, v. 24, p. 101171, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101171>.

FLOHÉ, Leopold. Changing Paradigms in Thiology. **Methods in Enzymology**. [S. l.]: Elsevier, 2010. v. 473, p. 1–39. DOI 10.1016/S0076-6879(10)73001-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687910730019>. Acesso em: 30 abr. 2020.

FRÉZAL, Lise; FÉLIX, Marie-Anne. *C. elegans* outside the Petri dish. **eLife**, v. 4, p. e05849, 30 mar. 2015. <https://doi.org/10.7554/eLife.05849>.

GAY, Craig A.; GEBICKI, Janusz M. Perchloric Acid Enhances Sensitivity and Reproducibility of the Ferric–Xylenol Orange Peroxide Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 304, n. 1, p. 42–46, maio 2002. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5566>.

GOODMAN, Miriam B.; SENGUPTA, Piali. How *Caenorhabditis elegans* Senses Mechanical Stress, Temperature, and Other Physical Stimuli. **Genetics**, v. 212, n. 1, p. 25–51, maio 2019. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300241>.

GRIFFITH, Owen W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 207–212, jul. 1980. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6).

GUHA, Sujay; KONKWO, Chigoziri; LAVORATO, Manuela; MATHEW, Neal D; PENG, Min; OSTROVSKY, Julian; KWON, Young-Joon; POLYAK, Erzsebet; LIGHTFOOT, Richard; SEILER, Christoph; XIAO, Rui; BENNETT, Michael; ZHANG, Zhe; NAKAMARU-OGISO, Eiko; FALK, Marni J. Pre-clinical evaluation of cysteamine bitartrate as a therapeutic agent for mitochondrial respiratory chain disease. **Human Molecular Genetics**, v. 28, n. 11, p. 1837–1852, 1 jun. 2019. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz023>.

HIBSHMAN, Jonathan D.; HUNG, Anthony; BAUGH, L. Ryan. Maternal Diet and Insulin-Like Signaling Control Intergenerational Plasticity of Progeny Size and Starvation Resistance. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 10, p. e1006396, 26 out. 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006396>.

HOSONO, Ryuji; MITSUI, Youji; SATO, Yoshiko; AIZAWA, Shinichi; MIWA, Johji. Life span of the wild and mutant nematode *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Gerontology**, v. 17, n. 2, p. 163–172, jan. 1982. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(82\)90052-3](https://doi.org/10.1016/0531-5565(82)90052-3).

HU, Patrick J. Dauer. **WormBook**, 2007. DOI 10.1895/wormbook.1.144.1. Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_dauer/dauer.html. Acesso em: 17 jan. 2021.

HUNT, Piper Reid. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50–59, jan. 2017. <https://doi.org/10.1002/jat.3357>.

HUNT, Piper Reid; OLEJNIK, Nicholas; SPRANDO, Robert L. Toxicity ranking of heavy metals with screening method using adult *Caenorhabditis elegans* and

propidium iodide replicates toxicity ranking in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3280–3290, set. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.051>.

JEONG, Dae-Eun; LEE, Yujin; LEE, Seung-Jae V. Western Blot Analysis of *C. elegans* Proteins. *In*: HUANG, L. Eric (org.). **Hypoxia: Methods and Protocols**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer, 2018. p. 213–225. DOI 10.1007/978-1-4939-7665-2_19. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7665-2_19. Acesso em: 16 jan. 2021.

KALETTA, Titus; HENGARTNER, Michael O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387–399, maio 2006. <https://doi.org/10.1038/nrd2031>.

KLAUNIG, James E. Oxidative Stress and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 40, p. 4771–4778, 15 mar. 2019. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190215121712>.

KOHL, Katharina; FLEMING, Thomas; ACUNMAN, Kübra; HAMMES, Hans-Peter; MORCOS, Michael; SCHLOTTERER, Andrea. Plate-based Large-scale Cultivation of *Caenorhabditis elegans*: Sample Preparation for the Study of Metabolic Alterations in Diabetes. **Journal of Visualized Experiments**, n. 138, p. 58117, 24 ago. 2018. <https://doi.org/10.3791/58117>.

LI, Jie; ZHANG, Donglan; JEFFERSON, Pearl A.; WARD, Kathleen M.; AYENE, Iramoudi S. A bioactive probe for glutathione-dependent antioxidant capacity in breast cancer patients: Implications in measuring biological effects of arsenic compounds. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 69, n. 1, p. 39–48, jan. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.10.004>.

LI, Ning; SIOUTAS, Constantinos; CHO, Arthur; SCHMITZ, Debra; MISRA, Chandan; SEMPF, Joan; WANG, Meiyong; OBERLEY, Terry; FROINES, John; NEL, Andre. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 4, p. 455–460, abr. 2003. <https://doi.org/10.1289/ehp.6000>.

LIGUORI, Ilaria; RUSSO, Gennaro; CURCIO, Francesco; BULLI, Giulia; ARAN, Luisa; DELLA-MORTE, David; GARGIULO, Gaetano; TESTA, Gianluca; CACCIATORE, Francesco; BONADUCE, Domenico; ABETE, Pasquale. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**, v. Volume 13, p. 757–772, abr. 2018. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>.

MASTROBERARDINO, Pier G.; ORR, Adam L.; HU, Xiaoping; NA, Hye Mee; GREENAMYRE, J. Timothy. A FRET based method to study protein thiol oxidation in histological preparations. **Free radical biology & medicine**, v. 45, n. 7, p. 971–981, 1 out. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.018>.

MORENO-ARRIOLA, Elizabeth; CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, Noemí; COBALLASE-URRUTIA, Elvia; PEDRAZA-CHAVERRI, José; CARMONA-APARICIO, Liliana; ORTEGA-CUELLAR, Daniel. *Caenorhabditis elegans*: A Useful Model for Studying Metabolic Disorders in Which Oxidative Stress Is a Contributing Factor. **Oxidative**

Medicine and Cellular Longevity, v. 2014, p. 1–9, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/705253>.

NIKI, Etsuo. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 595, p. 19–24, abr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.017>.

OCHI, Takafumi. Mechanism for the changes in levels of glutathione upon exposure of cultured mammalian cells to tertiary-butylhydroperoxide and diamide. **Archives of Toxicology**, v. 67, n. 6, p. 401–410, jul. 1993. <https://doi.org/10.1007/BF01977401>.

PAGE, Anthony. The cuticle. **WormBook**, 2007. DOI 10.1895/wormbook.1.138.1. Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_cuticle/cuticle.html. Acesso em: 26 mar. 2020.

PETERSON, Gary L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346–356, dez. 1977. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4).

PETRELLA, Lisa N. Natural Variants of *C. elegans* Demonstrate Defects in Both Sperm Function and Oogenesis at Elevated Temperatures. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112377, 7 nov. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112377>.

PILLAI-KASTOORI, Lakshmi; HEATON, Sam; SHIFLETT, Steve D.; ROBERTS, Annabelle C.; SOLACHE, Alejandra; SCHUTZ-GESCHWENDER, Amy R. Antibody validation for Western blot: By the user, for the user. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 4, p. 926–939, 24 jan. 2020. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010472>.

PORTA-DE-LA-RIVA, Montserrat; FONTRONDONA, Laura; VILLANUEVA, Alberto; CERÓN, Julián. Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. **Journal of Visualized Experiments**, n. 64, p. 4019, 10 jun. 2012. <https://doi.org/10.3791/4019>.

PUBCHEM. Tert-butyl hydroperoxide. [s. d.]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6410>. Acesso em: 12 jan. 2021.

RAHMAN, Irfan; KODE, Aruna; BISWAS, Saibal K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159–3165, dez. 2006. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>.

RIERA, Pedro T. Redox Status. **Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease**. Springer, Berlin, Heidelberg. 2012. https://doi.org/10.1007/978-3-540-29807-6_167

RUSZKIEWICZ, Joanna A.; TEIXEIRA DE MACEDO, Gabriel; MIRANDA-VIZUETE, Antonio; TEIXEIRA DA ROCHA, João B.; BOWMAN, Aaron B.; BORNHORST, Julia; SCHWERDTLE, Tanja; ASCHNER, Michael. The cytoplasmic thioredoxin system in *Caenorhabditis elegans* affords protection from methylmercury in an age-specific manner. **NeuroToxicology**, v. 68, p. 189–202, set. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.08.007>.

SIES, Helmut. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9–10, p. 916–921, nov. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00177-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00177-X).

SIES, Helmut. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, p. 613–619, 5 jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>.

SILVA-ISLAS, Carlos Alfredo; MALDONADO, Perla D. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. **Pharmacological Research**, v. 134, p. 92–99, ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.013>.

STIERNAGLE, Theresa. Maintenance of *C. elegans*. **WormBook**, 2006. DOI 10.1895/wormbook.1.101.1. Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html. Acesso em: 30 out. 2018.

STRAIN LIST - CAENORHABDITIS GENETICS CENTER (CGC) - COLLEGE OF BIOLOGICAL SCIENCES. [s. d.]. Disponível em: <https://cgc.umn.edu/strains?vt=all>. Acesso em: 20 set. 2020.

SUNDARAM', Meera; GREENWALD, Iva. Suppressors of a lin-12 Hypomorph Define Genes That Interact With Both lin-12 and glp-1 in *Caenorhabditis elegans*. , p. 19, [s. d.] .

TEJEDA-BENITEZ, Lesly; OLIVERO-VERBEL, Jesus. *Caenorhabditis elegans*, a Biological Model for Research in Toxicology. In: DE VOOGT, W.P. (org.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237**. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 237, p. 1–35. DOI 10.1007/978-3-319-23573-8_1. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-23573-8_1. Acesso em: 13 jan. 2021.

TIAN, Ye; LI, Zhipeng; HU, Wanqiu; REN, Haiyan; TIAN, E.; ZHAO, Yu; LU, Qun; HUANG, Xinxin; YANG, Peiguo; LI, Xin; WANG, Xiaochen; KOVÁCS, Attila L.; YU, Li; ZHANG, Hong. *C. elegans* Screen Identifies Autophagy Genes Specific to Multicellular Organisms. **Cell**, v. 141, n. 6, p. 1042–1055, jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.034>.

TREVISAN, Rafael. **DEFESAS CELULARES E SISTEMA ANTIOXIDANTE EM BIVALVES MARINHOS (*MYTILUS EDULIS* E *PERNA PERNA*) EXPOSTOS A METAIS**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

TYMOCZKO, John L.; BERG, Jeremy M.; STRYER, Lubert. **Bioquímica Fundamental**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 748 p.

WINTERBOURN, Christine C. The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide. **Methods in Enzymology**. [S. l.]: Elsevier, 2013. v. 528, p. 3–25. DOI 10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012405881100001X>. Acesso em: 1 fev. 2021.

WINTERBOURN, Christine C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicology Letters**, v. 82–83, p. 969–974, dez. 1995. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03532-x](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03532-x).

WINTHER, Jakob R.; THORPE, Colin. Quantification of thiols and disulfides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 838–846, fev. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.031>.

ŻAMOJĆ, Krzysztof; ZDROWOWICZ, Magdalena; JACEWICZ, Dagmara; WYRZYKOWSKI, Dariusz; CHMURZYŃSKI, Lech. Fluorescent Probes Used for Detection of Hydrogen Peroxide under Biological Conditions. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 171–200, 3 maio 2016. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1014085>.

APÊNDICE A – Protocolos de execução

METODOLOGIA FOX

MATERIAIS

- Solução de ensaio: xilenol laranja 2,5 mM; sulfato ferroso amoniacal 2,5 mM; ácido perclórico 1,1 M. Dissolver primeiramente o sulfato ferroso amoniacal no ácido perclórico e em seguida adicionar o xilenol laranja.
- Solução de peróxido 0,1 mM. É recomendável iniciar o preparo a partir de uma maior concentração e diluir novamente a partir desta.

MÉTODO

Em uma placa de 96 poços serão analisados simultaneamente as amostras e a curva padrão.

Para a curva padrão, pipete de 0 a 40 μL da solução de peróxido 0,1 mM e ajuste o volume dos poços com H_2O ultrapura para 225 μL , como o indicado na tabela abaixo. A concentração máxima de peróxido utilizada na curva padrão é de 16 μM .

Volume pipetado em cada ponto da curva padrão

[] peróxido (μM)	Peróxido 0,1 mM (μL)	H_2O (μL)	Solução de ensaio (μL)
0	0	225	25
1	2,5	222,5	25
2	5	220	25
4	10	215	25
8	20	205	25
16	40	185	25

Adicione a amostra para análise de forma que a quantidade de peróxido quantificada não ultrapasse a concentração mais alta da curva padrão de peróxido e complete o volume do poço para 225 μL .

Por fim, adicione 25 μ L da solução de ensaio em todos os poços. A placa deve ser incubada por 30 minutos ao abrigo da luz e em sequência a absorbância quantificada a 560 nm.

NOTAS

As soluções descritas nos materiais têm a vida útil curta, portanto, é preferível que sejam sempre preparadas no dia da análise.

É necessário que o peróxido utilizado na curva padrão seja o mesmo presente nas amostras.

É imprescindível que a solução de ensaio seja adicionada por último e no mesmo momento tanto na curva padrão quanto nas amostras.

METODOLOGIA QUANTIFICAÇÃO DE TIÓIS

MATERIAIS

- Ácido Perclórico 0,5 M
- Tampão potássio e fosfato 0,5 M pH 0,7; EDTA 5 mM
- Solução de neutralização: tampão potássio e fosfato 0,5 M; NaOH 0,3 M
- Amostra falsa: 1 mL de ácido perclórico 0,5 M e 1 mL de tampão potássio e fosfato 0,5 M; NaOH 0,3 M. Centrifugar a 15.000g por 1 minuto
- DTNB 5 mM diluído em tampão fosfato e potássio 0,5 M pH 7,0; EDTA 5 mM
- NADPH 100 mM diluído com solução de bicarbonato de potássio 0,5%
- GR 5 U/mL
- GSH 10 μ M diluída em tampão fosfato e potássio 0,1M pH 7,0
- GSH 10 μ M diluída em amostra falsa
- GSH 1 mM diluída em tampão fosfato e potássio 0,1M pH 7,0
- Tampão Tris/HCl 1 M pH 7,0; EDTA 1 mM
- Tampão Tris/SDS: Tris/HCl 1 M pH 7,0; EDTA 1 mM; sódio-dodecil-sulfato 32,5 mM
- Tampão Tris/SDS/NEM: Tris/HCl 1 M pH 7,0; EDTA 1 mM; sódio-dodecil-sulfato 32,5 mM; N-etilmaleimida 200 mM
- Mix de ensaio para análise de GSH-t: Diluir o NADPH 100 mM, tampão fosfato e potássio 0,5 M pH 0,7; EDTA 5 mM e DTNB 5 mM de acordo com o indicado

na tabela abaixo, para que estejam respectivamente nas concentrações de 250 μM , 125 μM e 100 μM . A quantidade preparada deve ser de acordo com a quantidade de poços utilizados na placa.

Número de poços	10	20	30	50	100
Tampão fosfato e potássio (mL)	0,5	1	1,5	2,5	5,0
H ₂ O (mL)	1,45	2,9	4,35	7,28	14,5
NADPH (μL)	5	10	15	25	50
DTNB (μL)	40	80	120	200	400
Volume final (mL)	2	4	6	10	20

Preparo das amostras

Homogeneizar 3.000 vermes em 300 μL de ácido perclórico 0,5 M e sonicar 6 vezes por 10 segundos em tubos de 1,5 mL. Centrifugar as amostras por 2 minutos a 15.000 g a 4 $^{\circ}\text{C}$. Destinar o sobrenadante para as dosagens de GSH total e NPSH e o pellet para PSH. Neutralizar 250 μL de sobrenadante com tampão potássio e fosfato 0,5 M; NaOH 0,3 M e em sequência centrifugar a 15.000 g por 1 minuto a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Análise de tióis proteicos

Adicionar ao pellet 1 mL de ácido perclórico 0,5 M para lavagem, sonicar 1 vez por 5 segundos e centrifugar a 15.000 g por 2 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. Descartar o sobrenadante. Adicionar 300 μL de Tris/HCl 1 M pH 7,4, SDS 1% e sonicar 1 vez. Deste preparo, retirar uma alíquota de pelo menos 20 μL para dosagem de proteína. Incubar 100 μL de amostra em duplicata com 200 μL de tampão Tris/SDS ou Tris/SDS/NEM (branco) e 10 μL de DTNB em tubos de 1,5 mL por 30 minutos sob agitação em temperatura ambiente. Após os 30 minutos, centrifugar a 15.000 g por 2 minutos. Retirar 250 μL do ensaio e medir a absorbância em 412 nm em placa de 96 poços juntamente com curva padrão de GSH de 0 a 100 μM , de acordo com os valores indicados na tabela abaixo. Este mesmo padrão de curva é utilizado para a análise dos níveis de NPSH.

[] GSH (μM)	GSH 1mM (μL)	H ₂ O (μL)	Tris/HCl (μL)	DTNB (μL)
0	0	50	200	0
0	0	40	200	10
4	1	39	200	10
8	2	38	200	10
12	3	27	200	10
40	10	30	200	10
100	25	15	200	10

Análise de tióis não proteicos

Utilizar 250 μL de sobrenadante neutralizado e adicionar 10 μL de DTNB em placa de 96 poços e incubar por 10 minutos juntamente com uma curva padrão de GSH. Utilizar a curva conforme a descrita em “análise de tióis proteicos”. Após a incubação, medir a absorbância em 412nm.

Análise de glutathiona total

Utilizar 30 μL de amostra, 20 μL de H₂O, 200 μL de MIX de ensaio e, adicionado imediatamente antes da análise, 10 μL de GR. Medir a absorbância em 412 nm por 5 minutos. Para os cálculos de atividade, utiliza-se a diferença entre a absorbância final e a inicial. Para referência de quantidade, utiliza-se uma curva padrão de GSH de 0 a 1,5 μM com as quantidades conforme a tabela abaixo.

[] GSH (μM)	GSH 10 μM (μL) em amostra falsa	GSH 10 μM (μL)	Amostra Falsa (μL)	H ₂ O (μL)	MIX (μL)	GR (μL)
0	0	0	30	20	200	10
0,1	0	2,5	30	17,5	200	10
0,2	0	5,0	30	15	200	10
0,4	0	10	30	10	200	10
0,7	17,5	0	12,5	20	200	10
1,1	27,5	0	2,5	20	200	10
1,5	30	7,5	0	12,5	200	10

NOTAS

O tampão Tris/SDS/NEM deve ser utilizado de preparo fresco.

Durante a homogeneização das amostras, os tubos devem ser alternados a cada sonicação para que permaneçam no gelo durante os intervalos, evitando que superaqueçam.

Após a neutralização do sobrenadante é importante que seja confirmado a neutralidade do pH da amostra

Ao pipetar as amostras para o branco, o ideal é que elas fiquem afastadas na placa de leitura, para que não haja contaminação com o NEM.

As curvas padrão referentes às dosagens de PSH e NPSH, cujos ensaios envolvem incubações, devem ser pipetadas com a mesma antecedência, para que os tempos de reação entre a curva e as amostras sejam os mesmos.

De acordo com os testes realizados, apesar do pH sobrenadante neutralizado indicar uma amostra neutra, ela apresenta uma pequena interferência na atividade da GR. Por isso, devemos adicionar 30ul de “amostra falsa” na curva padrão, simulando a quantidade de amostra utilizada.