



---

**RESUMOS APRESENTADOS NO 2º ENCONTRO DOS ALUNOS DE IC E ITI “INCENTIVO A JOVENS CIENTISTAS E A UMA CIÊNCIA JOVEM” - 2019 - INSTITUTO BUTANTAN.**

**1- Biodiversidade da Culicidofauna em uma floresta urbana localizada na Região Metropolitana de São Paulo**

Moura C. A.<sup>1</sup>, Moraes J. C. F.<sup>1</sup>, Rodrigues R. S.<sup>1</sup>, Barbosa E. P.<sup>1</sup>, Arratia A. L. D.<sup>1</sup>, Silva D. C.<sup>1</sup>, Araujo A. B.<sup>2</sup>, Izumisawa C. M.<sup>2</sup>, Figueiredo J. V. A.<sup>2</sup>, Silva R. E.<sup>2</sup>, Virginio F.<sup>1</sup>

1- Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan; 2- Centro de Controle de Zoonoses, Secretaria Municipal da Saúde, São Paulo, Brasil

Estudos recentes têm demonstrado que mudanças na biodiversidade afetam a saúde pública, principalmente a correlação entre perda de biodiversidade e aumento da transmissão de patógenos/incidência de doenças. Dentre as modificações significativas ocorridas no Brasil nos últimos anos, pode-se destacar a migração da população humana do ambiente rural para o urbano, o qual atualmente concentra um grande número de pessoas e abriga potenciais transmissores de agentes etiológicos, os mosquitos. As doenças vetorizadas por estes insetos, apresentam risco à população humana e ameaçam as áreas urbanas, envolvendo humanos e animais em ciclos enzoóticos de doenças infecciosas e parasitárias. Ademais, o processo de urbanização desordenada pode acelerar o processo de domiciliação de espécies com alta plasticidade, facilitando a rápida dispersão destes vetores; e a presença humana em áreas remanescentes de florestas inseridas nas áreas urbanas, proporciona novos criadouros e alimentação aos mosquitos, bem como a inserção de novos táxons, favorecendo a contínua manutenção das espécies destes insetos. Cerca de 500 espécies de mosquitos são encontradas no Brasil, variedade a qual fez com que em 2007 o Brasil fosse considerado o país com maior riqueza e um dos países com maior número de espécies endêmicas. Estudos pontuais em São Paulo, indicam alta abundância relativa de mosquitos nesta cidade. Esta cidade alberga cerca de 65 espécies distribuídas em 14 gêneros, com as quais a dinâmica ainda é pouco conhecida. Claramente, é um ambiente que possui condições ideais para manter populações de espécies de mosquitos e/ou servir de refúgio para espécies exóticas comumente encontradas na malha urbana, como *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*. A cidade de São Paulo está inserida na região da Mata Atlântica do sudeste brasileiro, possuindo 106 parques municipais. Estes parques, em geral, preservam resquícios da vegetação nativa, albergando lagos e servindo de abrigo para aves e mamíferos, além de serem visitados continuamente pela população como locais de lazer. Nos últimos anos, diversos levantamentos florísticos e faunístico têm sido realizados no parque do Instituto Butantan, um fragmento de mata cercado por áreas urbanizadas, que contém cerca de 2000 funcionários e colaboradores e atrai mais de 150 mil visitantes anualmente. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar abundância, riqueza e sazonalidade de mosquitos de importância médica em um fragmento florestal heterogêneo localizado no interior da malha urbana na Zona Oeste de São Paulo. Para tanto, mosquitos adultos fêmeas serão coletados entre os meses de janeiro a dezembro



de 2019, por meio da utilização de 15 armadilhas do tipo CDC. O esforço amostral será avaliado e a suficiência amostral será determinada por meio da construção da curva do coletor; para tanto, cada trilha (área amostral) será considerada como uma unidade amostral. A normalidade da distribuição dos dados e a homogeneidade de variâncias serão avaliadas. Em seguida, a diversidade e a abundância serão avaliadas tanto para o número total de amostras coletadas, quanto para o número de amostras obtido na análise de suficiência amostral, através dos índices de Shannon, Simpson e equabilidade de Pielou. Além disso, uma análise será realizada utilizando o diagrama de Whittaker para testar a existência de correlação entre a riqueza de espécies e sua equitatividade. Por fim, pretende-se avaliar se os padrões de diversidade nas diferentes trilhas amostradas, variam de acordo com a variabilidade de temperatura e umidade ao longo do ano. E finalmente, com base nos resultados, serão elaborados gráficos e realizados testes estatísticos para verificar se os grupos diferem ou não significativamente.

## **2- Variação na morfologia alar de *Culex nigripalpus* de diferentes estratos florestais em um parque urbano de São Paulo**

Moraes J. C. F.<sup>1</sup>, Moura C. A.<sup>1</sup>, Rodrigues R. S.<sup>1</sup>, Barbosa E. P.<sup>1</sup>, Arratia A. L. D.<sup>1</sup>, Silva D. C.<sup>1</sup>, Araujo A. B.<sup>2</sup>, Izumisawa C. M.<sup>2</sup>, Figueiredo J. V. A.<sup>2</sup>, Silva R. E.<sup>2</sup>, Virginio F.<sup>1</sup>

1- Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan; 2- Centro de Controle de Zoonoses, Secretaria Municipal da Saúde.

A espécie *Culex nigripalpus* tem sido incriminada como vetor de patógenos em áreas urbanas em diversas cidades do mundo, bem como a de São Paulo. Esta cidade metropolitana está inserida na região da Mata Atlântica do sudeste brasileiro, sendo a mais populosa da América do Sul com cerca de 12 milhões de habitantes. Alguns estudos desenvolvidos neste município, indicam alta abundância de mosquitos na área urbana. Ademais, esta cidade alberga cerca de 65 espécies distribuídas em 14 gêneros; sendo que *Culex nigripalpus*, espécie nativa da América do Sul, foi um dos 10 táxons mais abundantes. Os mosquitos estão presentes em alta densidade nos parques urbanos do município de São Paulo, inclusive no Instituto Butantan, o qual é cercado por áreas antropizadas, composto por grande área verde composta por floresta heterogênea. Localizado a menos de 1,5 km do Rio Pinheiros, possui corpos d'água, os quais podem servir como criadouro natural permanente, bem como palmeiras e demais locais passíveis de serem criadouros naturais temporários de mosquitos. O aumento da temperatura e da pluviosidade/umidade está diretamente correlacionado com a promoção de maior quantidade de criadouros para muitas espécies de mosquitos. Um estudo piloto realizado neste mesmo parque no ano de 2018, demonstrou que cerca de 1000 indivíduos desta espécie estão distribuídos nos estratos florestais solo e copa. Dessa forma, consideramos que avaliar a existência de variação populacional em diferentes estratos florestais pode contribuir para o entendimento da relação patógeno-hospedeiro de *Cx. nigripalpus*. Marcadores genéticos são frequentemente utilizados para investigar variações



populacionais em mosquitos, no entanto, a técnica de biologia molecular ainda é de alto custo. Como alternativa econômica para esta técnica, a morfometria geométrica, com base em marcadores morfológicos, pode apontar padrões de variação inter e intra-populacional. Levando em consideração a importância epidemiológica de *Cx. nigripalpus*, sua alta abundância em parques de São Paulo, sua presença em diferentes estratos florestais no parque do Instituto Butantan, e a importância de estudos populacionais de espécies vetoras de patógenos, o objetivo deste trabalho é testar a hipótese de que existe variação populacional em fêmeas de *Cx. nigripalpus* coletadas em diferentes estratos florestais e entre meses quentes e úmidos e frios e secos no Instituto Butantan. Para tanto, mosquitos fêmeas adultos serão amostrados mensalmente entre os meses de janeiro a dezembro de 2019, por meio da utilização de 15 armadilhas luminosas do tipo CDC, com dois tipos de atrativos para as fêmeas hematófagas: gelo seco (emissão de CO<sub>2</sub>) e luz. Asas direitas ou esquerdas de cerca de 30 fêmeas de cada estrato (solo e copa), serão destacadas do tórax dos indivíduos e montadas entre lâmina e lamínula utilizando como meio de imersão Bálsamo do Canadá. Com base nas coordenadas cartesianas anotadas, a forma alar será reconstruída e analisada. Além disso, a análise de componentes principais será realizada para observação prévia de existência de tendência de disparidade entre as amostras. Em seguida, análises discriminantes, como a de variáveis canônicas e de reclassificação, serão realizadas para avaliar a existência e possível magnitude da disparidade entre as amostras em evidência. Dessa forma, espera-se que com este estudo, seja possível avaliar a existência e a magnitude da estratificação morfológica de populações de *Cx. nigripalpus*, além de contribuir e embasar futuros estudos sobre hábitos alimentares e transmissão de zoonoses relacionadas a esta espécie.

### 3- Análise parasitológica das serpentes de ilha ex-situ.

Paixão M.M.<sup>1</sup>, Garcia V.C.<sup>2</sup>, Kishi K.<sup>3</sup>, Fellone A.T.<sup>3</sup>, Almeida Santos S.M.<sup>2,3</sup>

1- Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Metodista de São Paulo (FMV-UMESP); 2- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo (FMVZ-USP); 3- Laboratório de Ecologia e Evolução - Instituto Butantan (LEEV – IB).

*Bothrops insularis* e *Bothrops alcatraz* são espécies criticamente ameaçadas de extinção e vítimas de biopirataria, habitando duas ilhas diferentes: Queimada Grande e Ilha de Alcatraz, respectivamente. A manutenção correta das espécies ex-situ e a compreensão de sua biologia são fundamentais para sua preservação. Os mais importantes parasitas de serpentes relatados na literatura são *Kalicephalus* sp., *Ophidascaris* sp. e *Rhabdias* sp. e protozoários são *Caryospora* sp., *Sarcocystis* sp. e *Cryptosporidium* sp. Cerca de 50 serpentes: 41 *Bothrops insularis*, (19 fêmeas e 22 machos) e 9 *Bothrops alcatraz*, (6 fêmeas e 3 machos) mantidas no Laboratório de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan para fins de conservação foram analisados através de exame de fezes. As técnicas de exame foram o método de flutuação de Willis-Mollay (1921), a técnica de



sedimentação e o exame direto. Foram encontrados nos exames coproparasitológicos ovos de *Syphacia obvelata* que é um parasita de ceco e cólon de camundongos. Eles só fazem o ciclo em roedores adultos e podem ser encontrados em serpentes que comem camundongos, sendo apatogênico para as mesmas. Esses ovos só foram encontrados nas serpentes *B. insularis* que se alimentam de camundongos de 25g, enquanto que as *B. alcatrazes* comem camundongos filhotes de 5g. A presença de pólenes de plantas pode ser um indício da água utilizada para os exames de sedimentação. Nestes exames, utilizou água de torneira não filtrada. A presença de pólenes de plantas não representa um problema, mas demonstra a necessidade de realizar o exame com água filtrada. Uma fêmea de *B. alcatraz* eliminou uma larva cestóide de *Ophiotaenia* sp. A presença desse parasita em cativeiro é um indício que o protocolo utilizado para essas espécies precisa ser reavaliado. A falta de ovos nos exames pode ser explicada pela eficiência dos protocolos de vermifugação utilizados no laboratório evitando-se assim que os parasitas possam se reproduzir e causar doenças. A presença de escamas e dentes fazem parte da biologia natural das serpentes que estão em constante renovação, trocando-os. Já a presença de cristais de açúcar faz parte do exame de flutuação que foi utilizado solução saturada de açúcar. Com os resultados obtidos, percebe-se que o tratamento profilático utilizado no laboratório tem se apresentado efetivo. A *Syphacia obvelata* é considerada um pseudoparasita, não havendo necessidade de tratamento. Para a presença de outros pseudoparasitas é necessário utilizar água filtrada para realização dos exames. A presença de um cestóide nas *B. alcatraz* será analisada, sendo reavaliado o protocolo de tratamento dessas espécies.

**Apoio Financeiro:** CNPq

#### **4- Comparação composicional e funcional do veneno de *Crotalus durissus terrificus* de duas diferentes regiões Brasileiras**

Silva Júnior L.N.<sup>1</sup>; Abreu L.S.<sup>1</sup>; Galizio N.C.<sup>1</sup>; Aguiar W.S.<sup>1</sup>, Lima E.O.V.<sup>1</sup>, Rodrigues C.F B.<sup>1</sup>, Serino-Silva C.<sup>1</sup>, Hatakeyama D.M.<sup>1</sup>, Tasima L.J.<sup>1</sup>, Kavazoi V.K.<sup>1</sup>, Sant'Anna S.S.<sup>1</sup>, Grego K.F.<sup>1</sup>, Tanaka-Azevedo A.M.<sup>1</sup>, Morais-Zani, K.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

O gênero *Crotalus* foi responsável por 2.188 acidentes registrados no Brasil nos anos 2015/16. A subespécie *C. durissus terrificus* (Cdt) tem ampla distribuição geográfica e pode apresentar variação intraspecífica na composição do veneno. O veneno de *C. durissus* brasileiras tem uma composição semelhante entre as 7 subespécies, apresentando, principalmente, variação quantitativa. O veneno de *C. durissus* é composto majoritariamente por crotamina, crotoxina, giroxina e convulxina, que são responsáveis pela sintomatologia dos acidentes crotálicos, caracterizados por graves ações neurotóxicas, miotóxicas e distúrbios hemostáticos. Embora a composição básica do veneno desta espécie seja semelhante, observou-se que as Cdt de Minas Gerais (MG) causam um efeito edematogênico mais evidente quando comparado com os sintomas



clássicos da espécie. O presente estudo visa avaliar as diferenças intraspecíficas que podem levar a uma maior atividade edematogênica entre os indivíduos de MG e os de São Paulo (SP). Os venenos foram coletados de Cdt mantidas em cativeiro no laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, 8 espécimes de SP e 7 espécimes de MG, que foram doados pela Universidade Federal de Uberlândia. A caracterização da composição proteica do veneno foi alcançada usando SDS-PAGE e RP-HPLC (High-Performance Reversed-Phase Liquid Chromatography), usando uma coluna C18 (Teknokroma Europa). A atividade coagulante foi analisada sobre plasma e fibrinogênio. ELISA foi utilizado para avaliar a interação entre o soro anticrotálico produzido pelo Instituto Butantan e as amostras de veneno. Algumas variações quantitativas e qualitativas foram observadas em algumas proteínas de veneno através de SDS-PAGE. Os resultados mostram diferenças nas bandas referentes à LAAO (60 kDa), indicando baixa concentração (SP 2 e SP 3) ou ausência (MG 4 e SP 1, 4 e 8) desta proteína. Por outro lado, bandas associadas a proteína giroxina (34 kDa) apresentaram intensidades semelhantes. Apenas um indivíduo (SP 3) apresentou uma banda com massa molecular abaixo de 10 kDa, correspondente à crotamina. Um padrão semelhante foi encontrado entre todos os indivíduos na RP-HPLC, indicando perfil proteico comparável, exceto para o indivíduo SP 3. Este indivíduo apresentou um pico extra relacionado à crotamina, confirmando os resultados obtidos por SDS-PAGE. Não foram encontradas diferenças nos perfis protéicos analisados, exceto pela presença de crotamina em um indivíduo, que pode ou não estar presente. Em relação à atividade coagulante, os venenos de espécimes de Cdt de SP foram mais coagulantes sobre o fibrinogênio em relação aos indivíduos de MG ( $p < 0.01$ ), embora não existam diferenças significantes observadas na atividade coagulante sobre o plasma. Além disso, o soro anticrotálico produzido pelo Instituto Butantan foi capaz de reconhecer de forma semelhante os venenos de SP e MG.

**Apoio Financeiro:** CNPq

#### **5- Obtenção de um fragmento variável de cadeia única do anticorpo contra a toxina LT de *Escherichia coli* enterotoxigênica: amplificação e junção dos domínios variável pesado e variável leve.**

Leite A.C.D.S.<sup>1</sup>, Henrique C.P.<sup>1</sup>, Luz D.<sup>1</sup>, Piazza R.M.F.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

*Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), é um dos principais patótipos bacterianos causadores de diarreia, afetando principalmente crianças menores de cinco anos e pessoas que viajam para áreas endêmicas. ETEC produz a enterotoxina termolábil (LT), que pode ser detectada por ensaios imunossorológicos empregando diversos anticorpos. Dentre os anticorpos utilizados, os fragmentos variáveis de cadeia única (scFv) apresentam-se como ferramentas eficientes para o imunodiagnóstico, pois mantem a homogeneidade e a especificidade dos anticorpos monoclonais, bem como são



produzidos de forma mais rápida e com baixo custo. Para obter o scFv contra a toxina LT é necessário amplificar os domínios leve (VL) e pesado (VH) separadamente pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para posterior junção dos mesmos. Assim, um dos objetivos do trabalho é padronizar as condições da PCR para obtenção e junção dos domínios VL e VH do scFv contra a toxina LT de ETEC. Para amplificação dos domínios VL e VH por PCR, foram utilizadas as condições iniciais preconizadas pelo protocolo da Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity, analisando-se as temperaturas de anelamento de 50, 55 e 60°C. As análises foram realizadas em gel de agarose 1%, após determinada a melhor temperatura de anelamento, as amplificações observadas para VL e VH foram purificadas do gel, através do kit QIAquick Gel Extraction e submetidas ao sequenciamento do tipo Sanger. Para realizar a amplificação conjunta dos dois domínios, a temperatura de anelamento padronizada foi mantida, analisando-se as reações com a Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity, bem como acrescidas de 0,75 e 1,5 % de DMSO. Os mesmos ensaios foram realizados com a Taq DNA Polymerase recombinante e os resultados analisados em gel de agarose 1%. Dentre as temperaturas de anelamento analisadas, a melhor observada para ambos os domínios foi a de 55°C. As bandas amplificadas em 400 pb para ambos os domínios foram submetidas ao sequenciamento do tipo Sanger, ao qual evidenciou 91% de cobertura e 90.4% de identidade para o domínio VL forward e, 84 % de cobertura e 99.3 % de identidade para VL reverse. Para o domínio VH forward a cobertura foi de 95% e 100% de identidade; e VH reverse obteve-se 88% de cobertura e 99.3% de identidade. Tais resultados evidenciam que os amplificados correspondem aos domínios VL e VH do scFv LT. Na amplificação conjunta de ambos os domínios, observou-se amplificações de 750 pb em todas as condições analisadas nos ensaios utilizando Taq DNA Polymerase recombinante. Desta forma, os resultados evidenciam que as condições padronizadas para amplificação dos domínios VL e VH por PCR foram corretas, bem como a amplificação conjunta dos mesmos utilizando Taq DNA Polymerase recombinante, ao qual será submetido, posteriormente, ao sequenciamento do tipo Sanger. Assim, a obtenção do scFv contra a toxina LT se torna cada vez mais próxima, para futura utilização no imunodiagnóstico de ETEC.

**Apoio Financeiro:** CNPq

#### **6- Purificação e sequenciamento de uma proteína nativa com atividade paralisante obtida a partir das glândulas salivares do carrapato *Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae)**

Benazzi C.L.<sup>1</sup>, Ferreira C.N.<sup>1</sup>, Coelho G.R.<sup>2</sup>, Pimenta D.<sup>2</sup>, Kamitani F.L.<sup>1</sup>, Mendonça R.Z.<sup>1</sup>, Simons S.M.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Parasitologia; 2 Laboratório de Bioquímica e Biofísica, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

*Ornithodoros brasiliensis* é restrito as regiões serranas do Rio Grande do Sul, bastante agressivo aos seres humanos, causando febre, dor e intensa reação inflamatória no local da picada, e em cães foi relatado paralisia nos membros inferiores e óbito. Alguns



carrapatos podem causar um efeito patológico em seus hospedeiros pela inoculação de componentes salivares não infecciosos. Esse efeito é chamado de toxicose associada à alimentação do carrapato, sendo a principal forma de toxicidade a paralisia, causada provavelmente pela secreção de substâncias complexas que vão atuar sobre a resposta imune, inflamatória e na hemostasia do hospedeiro, tornando-o imperceptível, entre estes efeitos está a analgesia. Os *Caenorhabditis elegans* foram escolhidos como modelo para teste de atividade de paralisia. Há a intenção destas moléculas poderem atuar no controle de tremores sem causa definida, doenças do Tique e dores crônicas, como também entender a fisiologia do carrapato. O objetivo deste trabalho é identificar e isolar moléculas nativas com atividade analgésica e/ou paralisante a partir das glândulas salivares de fêmeas *O. brasiliensis*. Os carrapatos foram alimentados com coelhos (CEUAIB Nº 9098310818). O extrato da glândula salivar (EGS) foi obtido através da maceração das glândulas e a determinação proteica por A 280 nm (NanoDrop). As amostras de EGS foram submetidas à coluna Resource Q (1 mL) – em sistema FPLC (ÄKTA-GE), os picos foram reunidos em pools, liofilizados, ressuscitados em água Milli-Q e dessalinizados (MicroSpin -GE), as amostras foram analisadas por SDS-PAGE a 12,5%. Para testes de atividade de paralisia, *C. elegans* (CEUAX Nº 6378051018) foram adicionados a uma placa de 96 poços contendo a amostra e observado por estereomicroscópio. As análises por espectrometria de massas foram realizados por RP-LCMS / MS e a partir da digestão das bandas e dos picos eluídos, os espectros resultantes foram pesquisados em bases de dados de ESTs e bibliotecas de cDNA de carrapatos. A partir do SDS-PAGE 12,5% foram reveladas bandas entre 10 e 240 kDa. Após o processo cromatográfico foram eluídos 11 picos, os picos P6, P7 e P8 evidenciaram a diminuição de movimento nos *C. elegans*. A análise por Ms/Ms identificou no P6 uma proteína com domínio TSGP1, relacionado com o sequestro de histamina e serotonina, que são mediadores químicos da inflamação. Análise proteômica (P7) indicou a presença de Neprilysina, sua função é inativar os hormônios glucagon, encefalinas e a substância P, que contribui para sensibilizar os receptores nociceptivos na membrana pós-sináptica ou através da interação com outros elementos, por exemplo, a histamina, serotonina e acetilcolina.

**Apoio Financeiro:** Fundação Butantan

## **7- “Vem borboletar”: combinando pesquisa e observação de borboletas no parque do Instituto Butantan**

Vieira A.S.<sup>1</sup>, Hingst-Zaher E.<sup>1</sup>, Accacio G.M.<sup>1</sup>, Candia-Gallardo C.<sup>2</sup>, Banov- Evora G.<sup>1</sup>, Virginio F.F.<sup>3</sup>

1- Museu Biológico, Instituto Butantan; 2- Laboratório de Ecofisiologia e Fisiologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 3- Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Áreas verdes em ambientes urbanas são fundamentais para a manutenção da biodiversidade, já que fornecem abrigo para muitas espécies animais e vegetais. Nas



idades, a principal experiência das pessoas com a natureza ocorre através de parques urbanos, por isso esses locais são perfeitos para a realização de atividades que despertam o interesse dos visitantes a respeito da conservação. Para estudar parte dessa biodiversidade, temos realizado o monitoramento das borboletas presentes no parque do Instituto, fazendo um levantamento da fauna desses insetos. O objetivo desse projeto é unir o conhecimento científico sobre a fauna de borboletas presentes no parque do Instituto Butantan, com divulgação científica e ciência cidadã, utilizando um atrativo jardim de borboletas para aproximar o público da natureza. Para isso, são realizados 4 censos mensais, em trilhas que cobrem parte dos 80 ha do parque. Em cada censo, observadores seguem uma rota estabelecida durante 3 horas, entre as 10:00 e as 14:00, registrando todas as espécies de borboletas detectadas. Alguns indivíduos são coletados por meio de rede entomológica, para serem incluídos na coleção de lepidópteros do Laboratório Especial de Coleções Zoológicas do Instituto Butantan. As atividades de divulgação científica serão feitas em um jardim composto por 3 espécies de flores atrativas para borboletas, que serão plantadas no parque do Instituto. Durante os 21 meses de estudo, foram registradas 314 espécies de borboletas de 6 famílias: 8 *Papilionidae*, 22 *Riodinidae*, 52 *Lycaenidae*, 24 *Pieridae*, 112 *Hesperiidae* e 96 *Nymphalidae*. Essa riqueza é superior à comumente encontrada na matriz urbana - cerca de 100 a 200 espécies - e equivale a aproximadamente 75% daquela esperada para o total do Instituto Butantan. Esse valor foi estimado a partir de dados obtidos em um estudo de longo prazo realizado na Cidade Universitária Armando Salles Oliveira (USP), que possui uma estrutura espacial muito semelhante à do parque e é separada apenas por uma via de 50 m de largura. A comunidade desses dois lugares é muito semelhante, mas a principal diferença em sua composição está na proporção de *Hesperiidae*, o que é explicado pela maior taxa de substituição de espécies dessa família em comunidades tropicais. Para capturar essa variabilidade e a riqueza esperada é necessário estender o estudo por mais tempo.

**Apoio Financeiro:** CNPq

#### **8- Termo-estabilidade de antivenenos: avaliação da formação de agregados proteicos**

Ramalho M.C.C.<sup>1</sup>, Conti O.E.S.<sup>1</sup>, Marcelino J.R.<sup>2</sup>, Tambourgi D.V.<sup>1</sup>, Squaiella-Baptistão C.C.<sup>1</sup>

1- Laboratório Imunoquímica; 2- Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Desde o desenvolvimento dos primeiros antivenenos, a imunoterapia passiva tem sido o pilar terapêutico no tratamento de envenenamentos por animais peçonhentos, sendo capaz de neutralizar as atividades tóxicas mais pertinentes. No Brasil, são utilizados soros heterólogos contendo fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, uma vez que a IgG intacta induz mais frequentemente reações adversas precoces. Entretanto, em trabalhos anteriores, foi demonstrado que muitos soros hiperimunes possuem, no produto envasado, moléculas





resistentes aos métodos de purificação, como IgGs íntegras, contaminantes e agregados proteicos, que podem ser formados ao longo do tempo de armazenamento, mesmo dentro dos prazos de validade. Estes agregados podem contribuir para o surgimento de reações adversas induzidas pela ativação do sistema complemento em pacientes submetidos à soroterapia. Assim, o presente projeto tem como objetivo mensurar a agregação proteica e avaliar a estabilidade de soros hiperimunes envasados em relação às mudanças de tempo e temperatura. Amostras foram incubadas previamente a 25°C e 37°C, e avaliadas em diferentes períodos de tempo. A dosagem proteica de todas as amostras mostrou um aumento aparente na concentração de proteínas durante o período de incubação, porém, é plausível que se trate de um falso positivo, por conta da turbidez, agregação proteica e aglutinação, podendo interferir diretamente na sensibilidade e especificidade do método BCA. Deve-se considerar também a hipótese de que a água contida nas amostras possa sofrer evaporação ao longo das incubações, intensificando a concentração proteica e interferindo na detecção de agregados. De qualquer modo, houve a detecção de moléculas de IgG íntegras nas amostras, indicando que estas têm resistido aos processos de digestão utilizados, contribuindo para a formação de agregados. Para corroborar a hipótese acima, a densitometria da eletroforese de amostras incubadas por 30 dias tanto a 25 °C como a 37 °C revelou que as bandas de alta massa molecular possuem maior densidade, sugerindo aumento da presença de agregados nesse período de incubação, em comparação com as amostras mantidas a 4°C. Para confirmar a agregação proteica, testes de Western blot para detecção de IgG estão sendo realizados. A atividade anticomplementar será determinada após a incubação das amostras com soro humano normal, avaliando-se a liberação de anafilatoxinas (C3a, C4a e C5a) in vitro. Até o momento, nossos resultados parciais sugerem que as amostras de soros hiperimunes não são totalmente estáveis em diferentes condições de tempo e temperatura, facilitando a formação de agregados proteicos.

**Apoio Financeiro:** FAPESP

### **9- Interações proteicas entre componentes do complexo de pré-replicação (CPR) de *Trypanosoma cruzi***

Pinna J.A.<sup>1</sup>, Vitarelli M.O.<sup>1</sup>, Elias M.C.Q.B.<sup>1</sup>

1- Laboratório Especial de Ciclo Celular, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

O parasita *Trypanosoma cruzi* apresenta um ciclo de vida heterogêneo, variando entre as formas tripomastigota (não-replicativa), epimastigota e amastigota (replicativas). Esse controle na replicação do DNA se dá por proteínas específicas que regulam a montagem de um complexo pré-replicativo (CPR). Visando compreender o funcionamento dessas proteínas, nosso grupo caracterizou uma proteína essencial para o processo, denominada Orc1/Cdc6, ela foi comprovada como parte do CPR de tripanossomas já que ao inibir sua expressão, houve um bloqueio na síntese de DNA. Outra proteína, denominada Orc1b,



não tem sua função totalmente clara, mas apresenta um provável papel regulador positivo na replicação. Em *Trypanosoma brucei*, Orc1b mostrou interagir com Orc1/Cdc6, mas em *T. cruzi* não há trabalhos que elucidem interações entre proteínas que participam do processo replicativo. Assim, esse projeto visa fazer ensaios para analisar possíveis interações entre Orc1b-Orc1b e Orc1b-Orc1/Cdc6 em *T. cruzi*. Para essas análises será utilizado Orc1/Cdc6 – HisTAG, purificada previamente em nosso laboratório; Orc1b – HisTAG; e Orc1b – MBP. Após purificada, Orc1b – MBP será fixada em coluna de amilose, e soluções contendo Orc1/Cdc6 - HisTAG e Orc1b - HisTAG serão passadas pela coluna afim de verificar se Orc1b interage com ela mesma e com Orc1/Cdc6. No caso de ocorrer interação esta será analisada usando Biacore, o qual irá caracterizar a afinidade molecular entre as proteínas. Até o momento, para padronizar o processo de indução da proteína recombinante Orc1b, foi feito teste de solubilidade, no qual foi utilizado 0,1mM IPTG por 2h, e concluiu-se que rTcOrc1b pode estar solúvel no citoplasma, mas que apresenta concentrações muito maiores em corpúsculos de inclusão. Já para a expressão de rTcOrc1b – MBP, foi construído o plasmídeo de expressão, usando o vetor pMAL – c2X, que já apresenta o gene codificante para proteína ligante à maltose (Maltose-binding Protein). Esse plasmídeo será então transformado em *E.coli*-BL21 quimiocompetente, para futura indução com IPTG, e então purificação da proteína, para que possam ser feitas as análises de interações.

**Apoio Financeiro:** CNPq.

## 10- Genotipagem de *Aedes aegypti*, mosquito vetor de múltiplos arbovírus

Tani L. F. <sup>1,2</sup>, Suesdek R. L. <sup>2</sup>.

1- Universidade Presbiteriana Mackenzie; 2-. Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

O mosquito da espécie *Aedes aegypti* é vetor de diversas arboviroses que afetam humanos atualmente. Dentre as doenças transmitidas por este inseto, as principais são: Febre amarela, Dengue, Chikungunya e Zika. A importância deste vetor se deve fundamentalmente à escassez de vacinas que possam combater de forma efetiva estas doenças. Desta forma, a principal medida para conter a proliferação destas arboviroses, é de controlar o mosquito. À vista disso, o estudo direcionado à microevolução de *Ae. aegypti* por marcadores genéticos microssatélites (SSRs) pode contribuir para estudos que visam controlar a proliferação e dispersão desse mosquito. Essa abordagem técnica é poderosa, porém pouco explorada, além de que o conhecimento acerca da variabilidade dos SSRs nesta espécie é ainda tímido. Visando minimizar essas lacunas epistemológicas, propomos utilizar *loci* microssatélites para estimar a variabilidade genética de uma amostra populacional de *Ae. aegypti* com baixa variabilidade genética (colônia endocruzada). Propomos também avaliar a informatividade dos *loci* utilizados, testando características fundamentais: desequilíbrio de ligação, alelos nulos e polimorfismo. Estimaremos a variabilidade genética de indivíduos colonizados de *Ae. aegypti* com base



na caracterização de 6 *loci* SSRs: A10; B07; AC7; AG2; AG7; C2A8. Esperamos ao final definir uma “baseline” de SSRs, ou seja, um exemplo-padrão de baixa variabilidade genética para compararmos com populações naturais futuramente. Pretendemos também definir um painel de *loci* SSRs padronizado para genotipagem visando quantificação de variabilidade. Serão amostradas 50 fêmeas de uma colônia de *Ae. aegypti* já estabelecida em cativeiro e endocruzada desde 2017, portanto portadora de baixa variabilidade genética. Subsequentemente ocorrerá a amplificação dos *locus* SSR A10; B07; AC7; AG2; AG7; C2A8, mediante a técnica de PCR multiplex. Juntamente aos SSRs será amplificado DNA ribossômico como controle de qualidade da reação. Posteriormente os produtos de PCR serão genotipados (com e sem fluorescência) e analisados. Até o momento o *loci* A10 foi amplificado para dez amostras de *Ae. aegypti*. O *locus* amplificado com sucesso em 6 indivíduos e o tamanho do amplicon esteve dentro do padrão (~240 pb). Alguns indivíduos foram negativos à amplificação de A10, sugestivo de alelo nulo. Para confirmação da nulidade, testaremos amplificabilidade do rDNA nos mesmos indivíduos. As amplificações de SSRs serão refeitas com primers fluorescentes para quantificação fina em aparelho de sequenciamento de DNA. Determinando-se o tamanho exato dos alelos, completaremos o painel de genotipagem da colônia. De posse do painel completo, faremos comparações com os perfis genotípicos de populações naturais de outras cidades do mundo e determinaremos os graus de variabilidade genética e suas implicações epidemiológicas.

**Apoio Financeiro:** Fundação Butantan

### **11- Identificação das proteínas responsáveis pela proteção contra o autoenvenenamento no plasma da serpente *Bothrops jararaca***

Chiou K.C.K.<sup>1,2</sup>, Serino-Silva C.<sup>2,3</sup>, Rodrigues C.F.B.<sup>2,3</sup>, Kavazoi V.K.<sup>2</sup>, Morais-Zani K.<sup>2,3</sup>, Grego K.F.<sup>2</sup>, Tanaka-Azevedo A.M.<sup>2,3</sup>

1- Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2 Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan; 3 Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

O envenenamento ofídico ocorre principalmente em países tropicais e subtropicais, podendo ultrapassar 40.0000 casos de envenenamento e 20.000 mortes por ano. Dentre as ocorrências, cerca de 85% são causadas por serpentes do gênero *Bothrops*. O veneno dessas serpentes é composto, principalmente, por enzimas como as metaloproteases, serinoproteases e fosfolipases A2. Estudos demonstram que serpentes possuem resistência natural ao autoenvenenamento, que foi relacionado à presença de determinados inibidores em seu plasma, porém seu mecanismo ainda não foi totalmente elucidado. Assim, este trabalho visa estudar os inibidores de metaloproteases presentes no plasma sanguíneo das serpentes *Bothrops jararaca*. Para isso, as proteases do veneno foram isoladas para a futura purificação dos inibidores. O veneno de *B. jararaca* foi fornecido pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, e foi fracionado por



cromatografia de gel filtração, utilizando uma coluna Sephacryl S200. Posteriormente, foi realizado o teste A280 para a quantificação proteica aproximada das frações. Para a investigação da presença de proteases nas frações, foram realizadas as atividades caseinolítica e colagenolítica. Além disso, SDS-PAGE 15% foi realizado para a caracterização da composição proteica das amostras. O fracionamento do veneno da *B. jararaca* resultou em 8 frações, que foram dosadas a A280. Com isso, foi realizado um teste caseinolítico, que apontou maior atividade na fração 3. Além disso, foram realizados o teste colagenolítico, para investigação da presença de metaloproteases; e SDS-PAGE, para a caracterização proteica das amostras e seleção da fração a ser acoplada na coluna de afinidade para a futura purificação do inibidor de metaloprotease presente no plasma de *B. jararaca*. Foi encontrada a atividade proteolítica do veneno da *B. jararaca*, sobretudo na fração 3. Os próximos passos consistem na identificação das metaloproteases na amostra, e sua utilização para purificação dos inibidores no plasma da *B. jararaca*.

**Apoio Financeiro:** CNPq

## 12- Caracterização do tratamento com a droga Nitisinona (NTBC) na fisiologia e expressão gênica em *Schistosoma mansoni*

Coelho H.S.<sup>1</sup>, Silveira G.O.<sup>1;2</sup>, Verjovski-Almeida S.<sup>1;2</sup>

1- Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan; 2- Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Com o crescimento de informações alarmantes sobre indivíduos infectados, manifestando a esquistossomose, formou-se a iniciativa de pesquisas mais elaboradas e aprofundadas para o tratamento e desenvolvimento de vacinas ou medicamentos inibindo a ação do agente causador. Mesmo diante de tantas descobertas encontra-se dificuldades para um tratamento mais qualificado, sendo o mais utilizado o paraziqantel, onde uma vez medicado o indivíduo corre o risco de submeter-se a uma nova infecção caso não haja prevenção. O *Schistosoma mansoni*, parasito causador da esquistossomose, é um verme que necessita passar por fases para sua maturação completa; os ovos dos parasitos depositados nas fezes de um hospedeiro mamífero quando em contato com a água eclodem formando o miracídio que migram para um hospedeiro intermediário (caramujo do gênero *Biomphalaria* spp.) se desenvolvendo ao esporocisto (primário e secundário), que então emerge para a água em forma de cercaria. Ao penetrar na pele do hospedeiro final sua calda é eliminada dando origem ao esquistossômulo, que circula pelos vasos sanguíneos direcionando as veias mesentéricas, completando seu ciclo se tornando adulto e por fim se pareando (onde a fêmea é albergada no canal ginecóforo do macho) com a fêmea produzindo ovos, que são depositados na corrente sanguínea e se direcionam a dois principais lugares: ao fígado causando a hepatomegalia (principal sinal clínico da doença) e ao lúmen do intestino, iniciando o ciclo novamente. Assim como alguns artrópodes, o *S. mansoni* é hematófago, e a digestão das proteínas do sangue



culmina na produção exacerbada de aminoácidos livres, que podem causar toxicidade a estes invertebrados. Desta forma, estes organismos escoram em mecanismos de detoxificação dos aminoácidos livres como as enzimas 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (HPPD) e aminotransferase (TAT), que degradam a tirosina. Diante deste fato, o uso de Nitisinona (NTBC), medicamento usado em pessoas com Tirosinemia tipo 1 (doença que incapacita a metabolização de tirosina) foi testada em artrópodes hematófagos observando-se a cristalização de tirosina causando oclusão no intestino destes organismos, interferindo na circulação da hemolinfa e levando a morte. Atinando tais resultados, vermes pareados de *S. mansoni* foram expostos a 3 diferentes concentrações de NTBC, expostos por um período de 72 horas, onde observamos diminuição na oviposição, presença de grânulos na casca dos ovos, desapareamento dos casais, diminuição de adesão dos parasitas a placa, diminuição da motilidade apesar de não observarmos nenhuma alteração da viabilidade dos mesmos. Posteriormente, iremos identificar a possível redução na expressão de genes relacionados a oviposição e maturação dos ovários nas fêmeas tendo em vista a redução na oviposição observada. Estes dados nos permitirão entender o efeito da droga NTBC na viabilidade dos parasitos, abrindo portas para o eventual uso terapêutico desta droga contra a esquistossomose. CEUA Nº177050816

**Apoio Financeiro:** CNPq

### **13- Caracterização bioquímica de venenos de serpentes do gênero *Philodryas* com diferentes hábitos alimentares.**

Tioyama E.C.<sup>1</sup>, Portes-Junior J.A.<sup>1</sup>, Moura-da-Silva A.M.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Imunopatologia – Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Dipsadidae é uma família de serpentes pertencente ao grupo das Caenophidias, sendo uma família ecologicamente diversa com aproximadamente 700 espécies descritas. As serpentes do gênero *Philodryas* sp. estão agrupadas dentro da família Dipsadidae e se destacam por serem as principais serpentes opistóglifas que produzem significativas quantidades de veneno sendo capazes inclusive de causar acidentes em humanos no continente Sul-Americano, caracterizado principalmente por ação local intensa, com dor, edema e hemorragia. Além de seu valor de interesse médico, vale destacar o interesse ecológico desta família. Em geral, possuem hábitos alimentares generalistas, se alimentando por pequenos roedores, lagartos, anfíbios e até mesmo outras espécies de serpentes. Em contrapartida, algumas espécies possuem hábitos alimentares especializados, como é o caso da *Philodryas agassizii* que se alimenta exclusivamente de artrópodes, fato este que torna essas serpentes fonte de novas pesquisas que abordam a relação entre a composição de seu veneno e características ecológicas dos animais, como a dieta diferenciada. Portanto, este trabalho visa realizar a caracterização bioquímica e funcional do veneno de cinco espécies: *P. patagoniensis*, *P. olfersii*, *P. nattereri*, *P. aestiva* e *P. agassizii*. Assim, poderemos contribuir para o melhor entendimento da composição



destes venenos com base nas preferências alimentares de cada espécie e se este fato modula ou não a composição do veneno.

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan e FAPESP

#### **14- Papel da Aldeído desidrogenase-2 na disfunção mitocondrial induzida por neuropatia periférica**

Silva G.G.<sup>1</sup>, Ferreira J.C. B.<sup>2,3</sup>, Behr B.<sup>1</sup> Mochly-Rosen D.<sup>3</sup>, Zambelli V.O.<sup>1,3</sup>

1- Laboratório Especial de Dor e Sinalização (LEDS), Instituto Butantan, Brasil; 2- Departamento de anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, Brasil; 3- Chemistry and Systems Biology, Stanford University, CA, EUA

As neuropatias são altamente prevalentes na população mundial e podem ter várias etiologias, incluindo trauma, neurotoxicidade induzida por drogas, diabetes e infecções virais. Um dos principais e mais debilitantes sintomas das neuropatias é a dor crônica. O modelo de constrição crônica do nervo ciático é um modelo amplamente utilizado como modelo em estudos pré-clínicos, uma vez que os animais respondem positivamente aos principais analgésicos utilizados clinicamente. O aldeído desidrogenase-2 (ALDH-2) é uma enzima mitocondrial responsável pela depuração de aldeídos reativos da célula, incluindo 4-hidroxinonenal (4-HNE). Este aldeído é formado a partir da oxidação de lipídios insaturados presentes na membrana mitocondrial e forma uma ligação covalente de alta afinidade com proteínas (aduto de Michaelis), resultando na inativação das proteínas alvo e consequente disfunção celular. Recentemente, demonstramos que, além do 4-HNE, o malondialdeído e o acetaldeído estão envolvidos na gênese da hiperalgesia inflamatória e neuropática e que a ALDH2 é uma enzima-chave para o seu controle, mas pouco se sabe sobre os mecanismos celulares envolvidos nesse efeito. Várias evidências experimentais mostraram que a disfunção mitocondrial desempenha um papel importante na gênese e manutenção da dor induzida pela neuropatia periférica. Assim, hipotetizamos que o desequilíbrio redox e o aumento dos níveis de aldeídos reativos induzidos pela constrição crônica do nervo ciático (CCI) prejudicariam a função mitocondrial da via nociceptiva periférica. Além disso, a ativação da ALDH-2 reverteria a produção de espécies reativas de oxigênio acompanhadas de melhora da função mitocondrial, contribuindo para a analgesia. Utilizando as estratégias de ganho e perda da função ALDH2, o objetivo deste projeto é investigar o envolvimento da enzima aldeído desidrogenase-2 no comprometimento da função mitocondrial envolvida na patogênese da dor neuropática. Para tanto, avaliaremos o consumo mitocondrial de O<sub>2</sub> no nervo ciático isolado na presença ou ausência de inibidores do complexo respiratório e produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial. Estes ensaios serão realizados em tecidos de animais que receberam Alda-1, uma molécula ativadora da ALDH-2, que possui efeito analgésico e em camundongos transgênicos com até 100% de deficiência na atividade enzimática da ALDH-2 (ALDH-2\*2). Juntos, os dados obtidos permitirão identificar os mecanismos celulares e moleculares



envolvidos na gênese e progressão da dor neuropática, além de contribuir para a caracterização de um novo alvo molecular para o controle da dor crônica. CEUA No 1980280818

**Apoio Financeiro:** CNPq

### 15- Seleção de Habitat de Aves Migratórias e Residentes em Ambientes Urbanos

Tosto, E.A.R.<sup>1</sup>, Hingst-Zaher, E.<sup>1</sup>, Candia-Gallardo, C.E.<sup>1</sup>

1 - Museu Biológico, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Foram estudadas seis espécies de aves migratórias que se reproduzem na cidade de São Paulo: *Tyrannus melancholicus*, *Tyrannus savana*, *Empidonomus varius*, *Myiodynastes maculatus*, *Lathrotriccus euleri* e *Vireo chivi*. Também estudamos duas espécies de aves residentes, *Pitangus sulphuratus* e *Megarynchus pitangua*. Nós comparamos os padrões de uso de habitat entre espécies migratórias e de aves residentes na presença e ausência de aves migratórias. Nosso objetivo é testar a hipótese de mudança de nicho proposta por MacArthur na década de 1970, que prevê que espécies semelhantes precisam se diferenciar em um ou mais nichos (por exemplo, tipo de habitat preferido) para evitar a concorrência e coexistir. Nosso objetivo foi descrever padrões espaciais de seleção de habitat de seis espécies de aves migratórias e duas residentes em um ambiente urbano heterogêneo e comparar padrões espaciais de seleção de habitat de espécies residentes na presença e ausência de espécies migratórias. Realizamos trabalho de campo em duas paisagens da cidade de São Paulo, uma no Instituto Butantan e outra nas proximidades da Universidade de São Paulo. Ambas as paisagens apresentam um ambiente urbano heterogêneo que abrange desde florestas até áreas totalmente urbanizadas e desprovidas de árvores. Coletamos dados para cada espécie ao longo de transectos padronizados utilizando a técnica spot-mapping, marcando pontos de ocorrência que foram plotados em um mapa digital. Quando os pontos formam clusters, é possível supor que estes são centros de atividade dessa espécie e, portanto, descrevem padrões de uso/seleção de habitat. Usamos binóculos para visualizar os indivíduos e o aplicativo ODK Collect para coletar, organizar e fazer backup de dados do spot-mapping. Calculamos a razão  $W_i$  de Manly, proporção entre habitat usado e habitat disponível, para cada tipo de ambiente, para as espécies que formaram clusters. Resultados e Discussão Foram detectados padrões de uso/seleção de habitat distintos para os migrantes *T. melancholicus*, *E. varius*, *M. maculatus* e *L. euleri*, e para as duas espécies residentes *P. sulphuratus* e *M. pitangua*, sem grande sobreposição aparente dos territórios dentro e entre as espécies. A razão  $W_i$  foi diferente entre *T. melancholicus*, *L. euleri* e *P. sulphuratus*, mas bastante similares entre *E. varius*, *M. maculatus* e *M. pitangua*. Os resultados nos mostram que *T. melancholicus* seleciona construções humanas, enquanto *L. euleri* seleciona ambientes mais arborizados. Para as outras espécies não foi possível verificar seleção de um ambiente específico. Os padrões podem mudar com o aumento do banco de dados.



**Apoio Financeiro:** Fundação Butantan

## **16- Análise da expressão de marcadores envolvidos no controle da proliferação celular em células de carcinoma oral tratadas com fosfoetanolamina associada ao quimioterápico cisplatina**

Peres M. E.<sup>1</sup>, Silva M.L.G.<sup>1</sup>, Rabelo D.C.<sup>1</sup>, Maria D.A<sup>1</sup>.

1- Laboratório de Biologia Molecular, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

O câncer oral é uma neoplasia maligna que abrange a região dos lábios e o interior da cavidade oral. Os tratamentos utilizados fazem uso da cirurgia ou radioterapia, ou ainda ambos em associação, contudo o prognóstico dos pacientes portadores de carcinoma oral é considerado pobre e baixo. Como método quimioterápico associativo, a cisplatina é indicada para tratamento de carcinoma oral e como possível futuro tratamento, a fosfoetanolamina sintética (Pho-s), os fosfolípídeos antitumorais estão presentes em um grupo de compostos que exercem um significativo efeito citotóxico sobre uma grande variedade de tumores. O objetivo deste trabalho é analisar por citometria de fluxo, o potencial elétrico mitocondrial ( $\Delta m\Psi$ ), o dano causado no DNA das células de carcinoma espinocelular de língua (SCC-9), tratadas com fosfoetanolamina sintética associada ao quimioterápico cisplatina. As células de carcinoma espinocelular de língua (SCC-9) e as células de fibroblasto humano (FN-1) foram cultivadas e preparadas para a realização dos testes: avaliação do potencial elétrico mitocondrial ( $\Delta m\Psi$ ), análise da expressão de marcadores e análise do dano de DNA (caspase-3 ativa, ATM fosforilada e histona H2AX), por citometria de fluxo. Todos os testes ocorreram com diferentes tratamentos (Pho-s, CIS e a associação Pho-s + Cis), no período de 24 horas. A avaliação do  $\Delta\Psi_m$ , as células FN-1 tratadas com Pho-s demonstraram que não houve quantidade significativa de células mortas que apresentaram modificações em seu potencial mitocondrial, nas concentrações de 10 e 20 mM, porém na associação de Pho-s + CIS, houve células mortas a partir da concentração de 10 mM, em comparação, nas células SCC-9 tratadas com Pho-s, houve quantidade de células tumorais mortas significativas, a partir da concentração de 10 mM, evidenciando a apoptose via mitocondrial e na associação, houve células tumorais mortas a partir da concentração de 30 mM. Na avaliação da expressão da caspase-3, as células de FN-1 tratadas com Pho-s não demonstraram quantidade significativas da expressão da caspase-3, no tratamento associativo, houve aumento da expressão da caspase-3 a partir da concentração de 10 mM, em contrapartida, nas células tumorais SCC-9 tratadas com Pho-s, houve um aumento da expressão da caspase-3 a partir da concentração de 10 mM e na associação, houve um aumento significativo da expressão de caspase-3 a partir da concentração de 10 mM, demonstrando o comportamento da Pho-s efeito dose dependente. Na análise do dano de DNA, as células FN-1 tratadas com Pho-s, demonstraram que nas concentrações de 10 mM e 20 mM não houveram danos significativos, na associação, houve um aumento no dano do DNA, a partir da concentração de 10 mM, nas células SCC-9 tratadas com Pho-s, houve um





aumento no dano do DNA, a partir da concentração de 10 mM e na associação, houve um aumento bastante significativo no dano do DNA nas células tumorais, envolvendo fosforilação da ATM e a alteração de histonas envolvidas no dano, a partir da concentração de 10 mM. O tratamento associativo da fosfoetanolamina com cisplatina se mostrou eficaz na modulação dos efeitos sinérgicos na inibição da capacidade proliferativa e na indução de morte celular por apoptose.

**Apoio Financeiro:** CNPq

### **17- Coleção entomológica e a divulgação de sua importância nas redes sociais: Como isso pode funcionar?**

Rodrigues R.S.<sup>1</sup>, Silva D.C.<sup>1</sup>, Virginio F.<sup>1</sup>

Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

As coleções zoológicas possuem grande importância para muitos estudos científicos, como para o ensino de ciências, e influenciam direta e indiretamente toda a vida na Terra. Por meio destas coleções é possível evidenciar a ocorrência espaço-temporal de diferentes espécies, estágio de vida e suas características morfológicas. Existem duas principais modalidades de coleções zoológicas: as científicas, as quais são destinadas à produção de pesquisas nas mais diversas áreas, como a taxonomia, e as didáticas, que são destinadas ao ensino por meio do contato dos alunos com o material em aulas práticas. Atualmente o Instituto Butantan (IBu) possui cinco coleções zoológicas, dentre elas a de entomologia médica. Desde 1912 recebe, registra e abriga na coleção entomológica um acervo de valor científico inestimável: exemplares de insetos de todo o Brasil. Esse fato se deve a contribuição de muitos pesquisadores que depositaram diversos espécimes-tipo há mais de 100 anos na coleção. Os insetos são alvos de biopirataria e/ou são tratados como objetos colecionáveis apenas com o objetivo de serem expostos em “gabinetes de curiosidade”. Entretanto, em muitas pessoas há ainda uma visão de aversão, o que remete a características comportamentais para evitarem contato com animais que possam ser vetores de doenças, por exemplo. Em outros momentos, os insetos podem passar despercebidos aos olhos humanos, ou quando notados, devido à falta de conhecimento sobre sua importância, são mortos, inclusive os inofensivos e necessários para o equilíbrio ecológico. Apesar de não estar aberta à visitação pública, a coleção de entomologia médica do IBu traz em sua essência um valor cultural importante, tornando necessárias soluções que viabilizem o seu acesso ao público em geral. Isso sugere a elaboração de novos recursos que otimize a relação da população com os insetos, por meio de ferramentas como as redes sociais para a divulgação de curiosidade e do conhecimento científico de uma forma simples e compreensível. Com isso, utilizaremos a conta @entomologia para divulgar parte do material abrigado na instituição, demonstrando ao público a importância, beleza e variedade destes animais. Ademais, será avaliado o engajamento e entendimento público acerca da importância do depósito de insetos em coleções entomológicas. Semanalmente posts serão destinados a um



inseto abrigado nesta coleção e um texto específico sobre ele será criado e outros posts serão criados baseados em artigos científicos ou matérias jornalísticas recentes. A coleta de dados será realizada de maio de 2019 a abril de 2020, por meio do buscador “Picodash”. Dessa forma, espera-se obter resultados que embasem o uso deste tipo de atividade de divulgação científica.

### **18- Análise testicular e das vias seminíferas do lagarto *Ameiva ameiva* (Squamata, Teiidae) durante as estações inverno e verão**

Ramalho R.A.<sup>1</sup>, Maciel E.S.<sup>2</sup>, Almeida-Santos S.M.<sup>1</sup>, Lobo L.M.<sup>3</sup>, Migliore S.N.<sup>3</sup>

1- Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan; 2- Laboratório de Anatomia Comparada, Universidade Estadual Paulista, UNESP; 3- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, PPG em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, São Paulo, Brasil

*Ameiva ameiva* é um lagarto pertencente à família Teiidae amplamente distribuído no território brasileiro e abundante no norte do estado de São Paulo. Sua reprodução ocorre durante todo o ano, entretanto no período de agosto a outubro e de janeiro a fevereiro a atividade reprodutiva se intensifica. Estudos sobre a morfologia tecidual, principalmente aos que se referem ao sistema reprodutor são escassos, especialmente quanto às espécies de teídeos. Esse trabalho visa analisar as estruturas do sistema reprodutivo de machos de *Ameiva ameiva* nas estações de inverno e verão através de análises histoquímicas e estereológicas, além de detectar a presença de secreção glicoproteica, fibras reticulares e quantidade de espermatozoides e células germinativas nos testículos utilizando técnicas de coloração e análise de imagens. Foram utilizados dez animais e os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IBILCE/UNESP sob o protocolo de número 177/2017. O parênquima testicular é formado por túbulos seminíferos circulares. O epitélio germinativo se apresentou mais espesso no inverno do que no verão. A quantidade de espermatozoides dentro dos túbulos seminíferos aumentou no verão e diminuiu no inverno. A rede testicular de *A. ameiva* apresenta um epitélio escamoso simples com estereocílios. Os ductos eferentes exibiram um epitélio cúbico simples com células ciliadas. O epidídimo apresenta-se como uma estrutura tubular constituída por células cilíndricas secretoras, células principais, e células basais, formando um epitélio pseudoestratificado menos espesso no inverno e mais desenvolvido no verão. O epitélio do canal deferente é semelhante ao do epidídimo, porém apresenta uma espessa camada de tecido muscular liso ao redor, sofrendo um aumento no inverno e diminuição no verão. O segmento sexual renal (SSR) foi identificado na zona periférica do rim como uma estrutura tubular, composto por células colunares elevadas com função secretora, sem diferenças significativas em seu diâmetro e espessura. Na coloração de ácido periódico de Schiff (PAS) nos testículos não houveram diferenças na secreção glicoproteica entre as estações de verão e inverno, mas a reação



ao PAS foi positiva. Em contraste, o epidídimo teve uma quantidade maior de secreção na região apical das células durante o verão. Os ductos deferentes e SSR não mostraram diferenças entre as estações. A coloração de reticulina de Gomori aplicada nos testículos evidenciou maior quantidade de fibras reticulares no inverno. No ducto epididimário da estação inverno fibras reticulares foram encontradas abundantemente ao redor do ducto. Nos ductos deferentes a presença de maior quantidade de fibras reticulares foi encontrada no verão. O SSR não apresentou diferenças na presença de secreção entre as duas estações. *A. ameiva* apresenta maior espermatogênese no verão comparada ao inverno, entretanto mais estudos se fazem necessários para descrever o ciclo reprodutivo da espécie.

**Apoio Financeiro:** CNPq

### **19- Polissacarídeo O como alvo antigênico para a formulação de uma vacina contra *Escherichia coli***

Silva H.G.S.<sup>1</sup>, Franzolin M.R.<sup>1</sup>, Anjos G.F.<sup>1</sup>, Duarte V.M.<sup>1</sup>, Barbosa A.S.<sup>1</sup>, Domingos M.O.<sup>1</sup>

Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

*Escherichia coli* O55 (*E. coli* O55) são patógenos emergentes responsáveis por diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítico-urêmica (SHU) em diversos lugares do mundo. Essas bactérias são encontradas em duas categorias distintas de *E. coli* diarrreiogênica: *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC O55) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC), sendo esta última considerada um dos principais agentes etiológicos responsáveis por hospitalizações em crianças e morte infantil. Além disso, como os patógenos emergentes, as cepas O55 têm o potencial de adquirir resistência contra antibióticos. Outro aspecto importante desses patógenos é o fato de que as infecções causadas por cepas STEC não podem ser tratadas com antibióticos, pois estimulam a produção e liberação da toxina Shiga, o que aumenta o risco de mortalidade. A melhor maneira de combater esses patógenos é desenvolver uma vacina. Nesse sentido, determinou-se neste trabalho se o polissacarídeo O55 seria um bom candidato como antígeno a ser utilizado em formulação de vacina contra *E. coli* O55. Portanto, foi determinada por ELISA a capacidade de anticorpos anti O55 para reconhecer diferentes cepas de *E. coli* O55 e cepas de sorogrupos não relacionados (O26, O111, O127). A capacidade destes anticorpos em inibir a adesão de a-EPEC O55: H7 a células HEp-2 foi investigada por incubação destas células com a-EPEC O55: H7 na presença ou ausência de anticorpos anti O55. A capacidade dos anticorpos em aumentar a fagocitose foi determinada por incubação de macrófagos J774A-1 com a-EPEC O55: H7 ou STEC O55:H19 na presença ou ausência de anticorpos anti O55. A capacidade dos anticorpos para aumentar a fagocitose foi determinada por incubação de macrófagos J774A-1 com EPEC O55: H7 ou STEC O55:H19 na presença ou ausência de anticorpos anti-O55. Os resultados demonstram que os anticorpos anti O55 foram capazes de reconhecer t-EPEC O55: H6, a-EPEC O55: H7 e STEC O55:H19 mas não cepas de sorogrupos heterólogos. Eles também foram capazes de inibir a adesão de *E. coli* O55 às células



epiteliais humanas. Além disso, os anticorpos foram capazes de aumentar a fagocitose de *E. coli* O55 pelos macrófagos e ajudar o sistema complemento a eliminar esses patógenos. Em resumo, os resultados indicam que o polissacarídeo O55 é um bom candidato como antígeno a ser utilizado na construção de uma vacina contra cepas de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O55.

**Apoio Financeiro:** CNPq

## **20- Papel da proteína MCM7 no status dormente da forma amastigota de *Trypanosoma cruzi***

Pereira K. B.<sup>1</sup>, Andrade T.O.<sup>1</sup>, Calderano S. G.<sup>1</sup>

Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

*Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas, apresenta um ciclo de vida complexo que varia entre formas replicativas e não-replicativas/infectivas. No hospedeiro mamífero ocorre a forma intracelular replicativa amastigota. Esta pode entrar em estado dormente (para a replicação) que além de serem resistentes ao tratamento com droga, permanecem capazes de diferenciar para a forma infectiva tripomastigota e dar continuidade à infecção logo após cessão do tratamento. Assim, entender o processo de transição do status replicativo para não replicativo emerge como essencial para entender a persistência destes parasitos durante a fase crônica da doença, quando as drogas existentes não apresentam eficácia. Neste contexto, a proteína MCM7 envolvida no processo replicativo do DNA se destaca por apresentar diferenças em seu padrão de expressão ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*, estando ausente nas formas não-replicativas, mas presente nas formas replicativas. Desta forma este projeto tem por objetivo caracterizar o papel da MCM7 no ciclo intracelular de amastigota (expressão e localização celular), assim como na metaciclologênese (transição da forma replicativa epimastigota para não-replicativa tripomastigota metacíclica). Utilizando a metodologia de CRISPR/Cas9 duas linhagens das formas epimastigotas de *T. cruzi* foram geradas, uma onde foi adicionado o epítipo MYC na porção C terminal da proteína MCM7 e outra com adição da proteína fluorescente (NeonGreen-NG) fusionada na porção N terminal desta mesma proteína. Ensaio de western blotting utilizando anticorpo anti-MYC e anti-NG mostraram bandas de migração de massa esperada. Destes parasitos foi realizado ensaio de imunofluorescência nas formas epimastigotas utilizando anti-NG. MCM7 apresentou localização nuclear em todas as fases do ciclo celular das formas epimastigotas (G1, S, G2 e M). Os resultados indicam que a proteína MCM7 fundida à NeonGreen é funcional uma vez que tem massa esperada e se encontram no núcleo, onde atuam na replicação do DNA. Ensaios de interação com o DNA estão sendo realizadas para definir o padrão de ligação ao DNA de MCM7 e confirmar sua funcionalidade. As formas epimastigotas contendo MCM7 fundida a NeonGreen estão sendo diferenciadas em tripomastigotas metacíclicas. Além de ensaios de imunofluorescência durante a metaciclologênese para avaliar a expressão de MCM7, tripomastigotas metacíclicas serão utilizados para infectar



células e obter amastigotas. Nestes amastigotas será feita dupla marcação: incorporação de EdU e imunofluorescência contra MCM7-NG. Desta forma, iremos determinar o padrão de localização de MCM7 nas formas amastigotas dormentes (EdU negativas) e em formas amastigotas replicativas (EdU positivas).

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan

## 21- Estudo do potencial vacinal da proteína LigB de *Leptospira* spp.

Lima J.B.M.<sup>1,2</sup>, Oliveira G.O.<sup>3</sup>, Souza Filho A.<sup>3</sup>, Heinemann M.B.<sup>3</sup>, Monaris D.<sup>2</sup>, Abreu P.A.E.<sup>2</sup>

1- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto; 2-Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo; 3-Laboratório de Zoonoses Bacterianas (FMVZ-USP), São Paulo, Brasil.

A leptospirose é uma zoonose com ampla distribuição mundial, causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*. No mundo, estima-se que sua incidência seja de aproximadamente um milhão de casos com 58.900 mortes por ano. As vacinas comerciais disponíveis são compostas por culturas de leptospirosas de diferentes sorovares inativadas (bacterinas). Atualmente, são utilizadas na pecuária e licenciadas para uso humano em poucos países. Apresentam baixa eficiência, pois promovem proteção somente contra os sorovares presentes na preparação e falham em induzir imunidade de longa duração. Como alternativa, tem sido proposto o desenvolvimento de uma vacina que possa apresentar proteção contra os diferentes sorovares patogênicos. A proteína leptospiral imunoglobulin (Ig)-like B (LigB) é considerada o antígeno vacinal mais promissor descrito até o momento. Resultados obtidos por diferentes grupos, sobre a capacidade da proteína LigB em induzir proteção contra a leptospirose em modelo de desafio letal em hamsters, são contraditórios. Neste sentido, pretendemos confirmar a capacidade de indução de resposta imunoprotetora desencadeada pela proteína LigB em modelo de desafio letal em hamsters, utilizando amostras de proteínas recombinantes purificadas com presença de estrutura secundária ordenada. As sequências codificantes da porção carboxi-terminal (LigBC) e amino-terminal (LigBN) foram clonadas no vetor de expressão pAE. As proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli*, as frações insolúveis purificadas por cromatografia de afinidade e, em seguida, analisadas por SDS-PAGE. A estrutura secundária das proteínas purificadas será verificada por difração circular (DC). Hamsters serão imunizados subcutaneamente com as proteínas purificadas em combinação com hidróxido de alumínio, como adjuvante (CEUA-FMZUSP 9490140818). Cada proteína recombinante purificada apresentou uma banda majoritária com tamanho esperado em SDS-PAGE. A integridade estrutural da LigBC foi avaliada por difração circular, que revelou uma estrutura secundária predominantemente de folha-beta. A proteína LigB parece ser um antígeno promissor para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra leptospirose.

**Apoio financeiro:** CNPq e FAPESP



## 22- Desenvolvimento do processo de purificação da pneumolisina recombinante geneticamente detoxificada obtida em *Escherichia coli*

Pires M.C.<sup>1</sup>, Crivellenti M.C.<sup>1</sup>, Mori R.M.<sup>1</sup>, Figueiredo D.B.<sup>1</sup>, Gonçalves V.M.<sup>1</sup>

Laboratório de Bioprocessos, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

*Streptococcus pneumoniae* é um importante patógeno humano que causa doenças graves com altas taxas de mortalidade. As atuais vacinas pneumocócicas são baseadas em polissacarídeos capsulares, mas seu custo de produção é alto e sua cobertura é limitada aos sorotipos incluídos na formulação, o que leva a uma pressão seletiva que causa a substituição do sorotipo, mitigando os benefícios da vacinação. Assim, as vacinas de proteínas são alternativas promissoras. Pneumolisina (Ply) é uma toxina hemolítica conservada entre todos os sorotipos e foi detoxificada geneticamente para ser utilizada como vacina. Embora os marcadores de afinidade sejam úteis para facilitar a purificação de proteínas recombinantes, eles precisam ser removidos para aplicação da vacina por meio de etapas caras e ineficientes, diminuindo o rendimento do processo e aumentando os custos. Este trabalho tem como objetivo desenvolver o processo de purificação da Ply (PdT) detoxificada recombinante, clonada sem marcador, a fim de ser empregada em novas vacinas pneumocócicas. A PdT foi clonado no vetor pET28a e produzido em *E. coli* BL21 (DE3) em um biorreator de 6 L com meio de auto-indução livre de origem animal, produzindo aproximadamente 544 g de biomassa. Suspendeu-se 20 g de biomassa em tampão bis-tris 10 mM pH 7,0 com Triton X-100 a 0,1%, EDTA 1 mM e PMSF 1 mM. As células foram lisadas em homogeneizador de alta pressão (PandaPlus). A clarificação foi feita por centrifugação a 10000 rpm a 4 ° C por 2 h. As amostras clarificadas foram aplicadas a uma cromatografia de troca aniônica (25 mL de Q-Sepharose FF, GE, diâmetro de 1,6 cm). Diferentes tampões de ligação (20 mM) foram avaliados: bis-tris-propano pH 7,0, trietanolamina pH 7,5, tris pH 8,0. A eluição foi feita com um gradiente ascendente linear 0-1 M NaCl. Os melhores resultados foram obtidos com trietanolamina e a PdT foi eluída entre 30-320 mM de NaCl, com 45% de pureza e 18,5% de recuperação. As frações eluídas da Q-Sepharose foram aplicadas a cromatografia de interação hidrofóbica. Quatro resinas (1 mL) foram testadas: Phenyl-Sepharose HP (GE), PY-Phe, PY-Iso, PY-C1 (Kopp Technologies). As duas primeiras resinas foram equilibradas com fosfato de sódio 20 mM pH 7,0 com NaCl 2 M, as outras duas foram equilibradas com o mesmo tampão, mas com NaCl 0,5 M. Todas as eluições foram feitas com um gradiente descendente linear até 0 M de NaCl. A Phenyl-Sepharose HP apresentou a menor perda de PdT no não-adsorvido e a maior pureza de PdT (72%) na fração de eluição entre 1620-240 mM de NaCl, com 5,1% de recuperação. Outras investigações estão sendo conduzidas para otimização e etapas adicionais de purificação serão avaliadas para atingir pureza > 95%.

**Apoio financeiro:** FAPESP



### 23- Reconhecimento de cepas patogênicas de *Leptospira* por anticorpos de hamsteres imunizados com vacinas produzidas com baixos níveis de LPS

Silva B.F.<sup>1</sup>, Silva J.B.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Causada por bactérias do gênero *Leptospira*, a leptospirose é uma zoonose de ordem mundial que atinge, principalmente, a zona urbana de países tropicais. No Brasil, foi registrada média anual de 3.700 casos, com taxa de letalidade de aproximadamente 10% e que pode alcançar 40% dos casos mais graves. Mesmo assim, as atuais estatísticas não refletem o panorama atual da doença no país, visto que a doença apresenta sintomas iniciais genéricos e é facilmente confundida com outras doenças endêmicas, tais como, dengue, gripes e outras viroses. Durante a infecção a bactéria atinge os órgãos do indivíduo, causando graves lesões no fígado, rim e pulmão, entre outros. As vacinas contra leptospirose existentes hoje são em sua maioria de uso veterinário, sendo constituídas de bactérias inativadas pelo calor. Essas apresentam curto prazo de proteção e são de baixa imunidade. As vacinas de uso humano ainda são raras, sendo elas também de preparações de *Leptospiras* inativadas. Apesar das limitações, devido à existência de múltiplos sorovares e imunidade sorovar específica das vacinas em razão da presença do LPS, tem havido, nos últimos anos, um crescente interesse pelo desenvolvimento de vacinas contra leptospirose. Dessa maneira, o referido projeto tem como principal objetivo analisar a capacidade de reconhecimento de proteínas de extratos de *Leptospira* por anticorpos presentes nos soros (segunda sangria e pós-desafio) dos animais imunizados com as diferentes vacinas desenvolvidas com baixos níveis de LPS. Para isso, foi utilizada a técnica de “SDS-PAGE”, em gradiente de concentração de 6 a 20% para separação das proteínas presentes nos extratos e Western Blotting. Foram usados extratos de espécies patogênicas de *Leptospira* (*L. interrogans* sorovares Copenhageni; Pomona (LPF); Canicola (LO4); Hardjo; Icterohaemorrhagiae e Bataviae) e a espécie não patogênica *L. biflexa* sorovar Patoc. Os resultados demonstraram capacidade de reconhecimento pelos anticorpos de todas as cepas patogênicas, com exceção da espécie *L. biflexa* sorovar Patoc. Também foi observado um aumento do reconhecimento de proteínas pelos anticorpos presentes no soro obtido após o desafio em relação ao da segunda sangria, demonstrando a capacidade de indução de anticorpos nas imunizações e reconhecimento de diferentes sorovares patogênicos de *Leptospira*. Além disso, foi observada acentuada variação de reconhecimento de acordo com o sorovar analisado. Com isso, podemos concluir que as vacinas produzidas com baixos níveis de LPS é uma estratégia promissora para a proteção contra diferentes sorovares patogênicos de *Leptospira*.

**Apoio financeiro:** CNPq



---

## 24- Estocagem espermática em *Crotalus durissus*: Como ela ocorre?

Jurkfitz R.C.<sup>1,3</sup>, Silva K.M.P.<sup>2</sup>, Almeida-Santos S.M.<sup>3</sup>

1- Universidade Guarulhos; 2- Programa de Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo; <sup>3</sup> Laboratório de Ecologia e Evolução Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

O ciclo reprodutivo de *Crotalus durissus terrificus* é marcadamente sazonal e sincrônico entre os indivíduos. O início da vitelogênese ocorre no verão e coincide com a cópula. Entretanto, decorrente da cópula ser dissociada da ovulação a estocagem de espermatozoides é obrigatória. Em viperídeos, a estocagem de espermatozoides no trato reprodutivo feminino ocorre em duas regiões: no infundíbulo posterior e útero aglandular - devido a uma contorção na região chamada “útero muscular twisting” (UMT). Essa torção permite que o espermatozoide permaneça estocado em criptas, no inverno, entre os meses de julho a setembro. A sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo ainda é desconhecida. Este trabalho visa relacionar a natureza histoquímica e a estocagem e ascensão dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino com o ciclo de *C. d. terrificus*. *Crotalus d. terrificus* possui estocagem de espermatozoides e presença de UMT em diversos estágios reprodutivos. A estocagem foi observada no útero aglandular e apesar do infundíbulo posterior apresentar receptáculos de estocagem, não foram observados espermatozoides na região. A UMT foi observada em todas as fêmeas que apresentaram estocagem. Espermatozoides foram observados ascendendo o útero glandular nos meses de julho e setembro. As análises histoquímicas evidenciaram a possível capacidade de armazenamento dos espermatozoides no útero aglandular. Os resultados obtidos até o momento ajudam no entendimento das estratégias reprodutivas e das possíveis aplicações em biotecnologias da reprodução para a conservação da espécie.

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan

## 25- Impacto do armazenamento de plasmas hiperimunes na formação de agregados proteicos

Saladini L.Y.<sup>1</sup>, Ramalho M.C.C.<sup>1</sup>, Marcelino J.R.<sup>2</sup>, Tambourgi D.V.<sup>1</sup>, Squaiella-Baptistão C.C.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Imunoquímica; 2- Seção de Processamento de Plasmas Hiperimunes, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Segundo a OMS, a raiva é ainda uma das principais causas de mortes humanas em diversos países. De acordo com a mesma, a administração de soros antirrábicos é obrigatoriamente recomendada para pacientes que sofreram exposição ou contato com a raiva de categoria III, isto é, que sofreram exposição a mordidas ou arranhões profundos, contato de mucosas com saliva ou até mesmo a morcegos. Desde o desenvolvimento do





primeiro soro antirrábico no final do século XIX, a soroterapia tem sido o método mais eficaz contra as atividades nocivas causadas pelo vírus. Para o êxito do tratamento, é necessário que o plasma equino passe por um processo de purificação, para remover constituintes inespecíficos, além da clivagem da IgG e obtenção de fragmento F(ab')<sub>2</sub>. O processamento parte de volumes muito grandes de plasma, obtidos de vários cavalos imunizados. Na impossibilidade de realizar a sangria de vários cavalos ao mesmo tempo, muitas vezes os plasmas permanecem armazenados a 4°C durante dias, até que o volume total seja atingido. Em seguida, o plasma é submetido ao processo de purificação, até a obtenção do produto final envasado. Trabalhos anteriores demonstraram a presença de agregados proteicos no produto envasado. Na tentativa de contribuir para a remoção de agregados e/ou prevenir sua formação, nosso grupo vem trabalhando em diversos projetos, buscando detectar os pontos críticos para a formação de agregados ao longo do processo produtivo. Assim, o presente projeto tem o objetivo de verificar a estabilidade térmica dos plasmas ao longo do tempo, avaliando a formação de agregados proteicos. Para mensurar o impacto do tempo e temperatura em cada amostra, foram realizadas avaliações qualitativas e quantitativas em relação aos constituintes presentes, podendo assim comprovar a presença de agregados. Por isso, alíquotas de plasma antirrábico foram incubadas em diferentes condições de tempo e temperatura. Foi realizada em seguida, avaliação de dosagem proteica das amostras de plasma, a qual demonstrou variação relativa em relação à concentração proteica nos diferentes períodos de incubação, podendo ser resultado de uma interferência no método BCA, por conta da formação de agregados, turbidez e aglutinação. Entretanto, comparando com resultados anteriores do nosso laboratório, a variação observada foi mínima, e bem menos evidente do que a observada nos produtos envasados. As amostras foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE, para comprovar a presença de agregados proteicos, que serão avaliados na densitometria de bandas, de acordo com sua massa molecular. Até o momento, a análise qualitativa dos géis não demonstrou aumento da presença de agregados proteicos nos plasmas armazenados em diferentes temperaturas, ao longo do tempo, confirmando os resultados obtidos na dosagem proteica. Nossos resultados parciais sugerem que os plasmas são estáveis ao longo do tempo, e que o armazenamento dos mesmos provavelmente não é um ponto crítico na formação de agregados.

**Apoio financeiro:** CNPq

## **26- Neuroplasticidade em serpentes: relação entre o uso espacial e o volume do córtex médio-dorsal de cascavel (*Crotalus durissus*, Viperidae)**

Nunes J.M.A.<sup>1,2</sup>, Banci K.R.S.<sup>1</sup>, Marques O.A.V.<sup>1</sup>.

1- Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan; 2- Universidade Mogi das Cruzes, São Paulo, SP, Brasil



Neuroplasticidade é a capacidade que o tecido cerebral tem de sofrer mudança, remodelamento e reorganização estrutural e funcional, devido a processos de aprendizado e memorização. Um dos tecidos cerebrais que sofrem processos de neuroplasticidade é a região hipocampal. Muitos estudos relatam que a região hipocampal está relacionada à memória, ao aprendizado e ao desenvolvimento de habilidades de uso espacial. Dados da literatura demonstram correlações positivas entre o volume do hipocampo e aspectos de ecologia espacial em mamíferos e aves. Em répteis-não-aves os córtices medial e dorsal são considerados homólogos ao hipocampo de mamíferos e aves. Os poucos trabalhos com Squamata (lagartos e serpentes) têm demonstrado uma correlação positiva entre o uso intensivo do ambiente e o aumento na taxa de neurogênese e no volume cortical. Porém, o conhecimento sobre serpentes ainda é bastante escasso. A cascavel (*Crotalus durissus*) é uma serpente de distribuição bastante abrangente no Brasil, ocorrendo principalmente em áreas abertas e secas do cerrado. Esta espécie é responsável por cerca de 8% dos acidentes ofídicos no país, e seu veneno é de grande interesse médico e farmacêutico. Com o intuito de extrair veneno de serpentes para pesquisa e produção de soros e medicamentos, a criação destes animais em cativeiro se fez necessária. Contudo, a criação das serpentes em cativeiro intensivo pode influenciar a anatomia e a fisiologia dos animais. Com base nestes fatos, o presente estudo tem como objetivo testar a hipótese de que as serpentes criadas em cativeiro desde filhotes possuem menor volume da área hipocampal (córtices medial e dorsal) do que as cascavéis providas da natureza, uma vez que ficam confinadas a espaços bastante restritos. Para tanto, machos e fêmeas de cascavéis provenientes de cativeiro e da natureza, terão seus córtices medial, dorsal e lateral analisados e medidos (Protocolo CEUAIB nº 8797030818). Os crânios dos animais serão dissecados, e, após prévia fixação, serão feitos cortes histológicos dos encéfalos (50µm). Estes cortes serão sequencialmente montados em lâminas gelatinizadas e corados por meio da técnica de Nissl, para marcação de corpos celulares de neurônios.

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan

## **27- Estado reprodutivo de borboletas Ithomiini (Nymphalidae, Danainae) ao longo do ciclo anual**

Lelis O.C.<sup>1</sup>, Navas C.<sup>2</sup>, Candia-Gallardo C.<sup>1,2</sup>, Hingst-Zaher E.<sup>1</sup>

1- Museu Biológico, Instituto Butantan; 2- Departamento de Fisiologia da USP, São Paulo, Brasil

Adaptações comportamentais e fisiológicas que permitem aos organismos lidar com as mudanças ambientais são cruciais para sua sobrevivência e reprodução. Muitos insetos lidam com a sazonalidade usando a diapausa, uma estratégia preditiva sincronizada com a variação anual no fotoperíodo. Diapausa é um estado de baixa atividade metabólica caracterizado por maior resistência a fatores abióticos, mudanças no comportamento e interrupção do crescimento e reprodução. No entanto, as rápidas mudanças climáticas



impõem desafio sério aos organismos: como conciliar estratégias preditivas baseadas em sinais ambientais (por exemplo, diapausa sincronizada ao fotoperíodo) com rápidas mudanças ambientais e a ocorrência cada vez mais frequente de condições climáticas extremas? Aqui vamos testar a hipótese de diapausa em borboletas *Ithomiini* analisando seus caracteres reprodutivos ao longo do ciclo anual. Essas borboletas formam agregações densas e localizadas de múltiplas espécies durante o inverno / estação seca, durante as quais suspeitamos que elas se encontram em diapausa. Nossa hipótese prevê que atividade reprodutiva (medida por características morfológicas das gônadas) será suprimido durante o inverno / estação seca. Nosso objetivos são: i) Analisar o desenvolvimento das gônadas (morfologia e histologia) de indivíduos *Ithomiini* criados em cativeiro para caracterizar o desenvolvimento normal das gônadas e ii) analisar a morfologia gonadal / histologia de indivíduos capturados na natureza para verificar se existem diferenças entre as estações. Foram coletados indivíduos adultos de quatro espécies de *Ithomiini* que ocorrem no Parque do Instituto Butantan durante o verão de 2018-19. Removemos e medimos as gônadas dos indivíduos coletados. Preparações histológicas serão realizadas para uma subamostra de cada estação / espécie, e o estágio de maturação celular será verificado. Diferenças em medições gonadais / maturação entre estações serão testadas por modelos lineares ou por testes de randomização equivalentes. A variável preditora nestes testes será estação do ano e as variáveis resposta serão medições de gônadas / estágio de maturação. Até o presente momento, coletamos vinte indivíduos da espécie *Epityches eupompe*, vinte *Mechanitis polymnia*, dezessete *Mcclungia cymo salonina* e quatorze *Hypothyris ninonia daeta*, machos e fêmeas. Até o momento, analisamos a morfologia das gônadas de fêmeas de *Epityches eupompe* e *Mechanitis polymnia* capturadas durante o verão de 2019. A hipótese da diapausa será falsificada para uma dada espécie se não encontramos redução significativa nas medidas/maturação das gônadas durante o inverno. Nós atualmente, estamos desenvolvendo protocolos de captura para atingir o objetivo i.

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan

## **28- Clonagem, expressão e caracterização in vitro de uma acetilcolinesterase isolada do veneno da centopeia *Cryptops iheringi***

Zamami G.Y.<sup>1</sup>, Magalhães G.S.<sup>1</sup>, Nishiyama-Jr M.Y.<sup>3</sup>, Oliveira U.C.<sup>3</sup>, Junqueira-de-Azevedo I.L.M.<sup>3</sup>, Barbaro K.C.<sup>1</sup>, Shimokawa-Falcão L.H.A.L.<sup>1,2</sup>.

1- Laboratório de Imunopatologia; 2- Pós-Graduação Toxinologia; 3- Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Centopeias da classe *Chilopoda*, também conhecidas como lacraias, são um grupo de artrópodes venenosos vastamente distribuídas ao redor do mundo. Por serem bem adaptadas a áreas urbanas e domésticas, diversos casos de acidentes são reportados em humanos. Um estudo clínico com pacientes atendidos no Hospital Vital Brazil no Instituto Butantan, mostrou que a maioria dos acidentes com centopeias (90%) foram causados



pelo gênero *Cryptops* e *Otostigmus*. Foi mostrado que apesar do envenenamento não ser letal, é necessária atenção médica devido a sintomas incômodos como dor, queimação, parestesia, edema local e necrose superficial no local da mordida. Apesar da literatura mostrar que os venenos dessas centopeias possuem diversos compostos bioativos, alguns deles com potencial terapêutico, pouco se sabe sobre essas toxinas. Nosso objetivo é a clonagem da acetilcolinesterase isolada do veneno de *C. iheringi* em sistema bacteriano. Transcritos obtidos através do sequenciamento de nova geração Illumina foram submetidos a uma busca de similaridade através do algoritmo BlastX no database no Uniprot. Transcritos que correspondiam à acetilcolinesterase foram escolhidos para produzir um gene sintético e posteriormente expresso em sistema bacteriano. A sequência de acetilcolinesterase foi clonada no vetor pET-41a e expressa em forma solúvel com a proteína de fusão (GST-tag). A acetilcolinesterase é uma colinesterase importante nas sinapses colinérgicas presentes no nosso sistema central e periférico, fato que torna essa enzima um alvo para o desenvolvimento de novas drogas. Atualmente, na literatura, não há casos de estudos dessa enzima no veneno de centopeias, sendo assim, talvez essa seja a primeira vez que uma acetilcolinesterase é descrita para essa classe de veneno.

**Apoio financeiro:** CNPq

### **29- Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo alternativo para o desenvolvimento de novos compostos analgésicos e hiperalgésicos.**

Freire F.P.<sup>1</sup>, Zambelli V.O.<sup>1</sup>, Ferreira M.L.<sup>2</sup>, Santa-Cecilia F.V.<sup>1</sup>

1 - Laboratório Especial de Dor e Sinalização (LEDS); 2 - Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA), São Paulo, Brasil.

A dor afeta milhões de pessoas ao redor do mundo e é uma das queixas mais frequentes na clínica. De acordo com a Associação Internacional para Estudo da Dor (em inglês, IASP), dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos. Já a nocicepção se refere ao processamento do sistema nervoso central e periférico da informação sobre o ambiente externo e interno, gerado pela ativação de nociceptores. Assim, a dor não inclui somente a percepção consciente de um evento sensorial, mas também a análise da resposta cognitiva e emocional associadas com a experiência de dor. As dores aguda e crônica são frequentemente debilitantes, resultando em custos fisiológicos, emocionais e econômicos graves, afetando uma grande porcentagem da população global. Contudo, o desenvolvimento de agentes analgésicos terapêuticos baseados principalmente no desenvolvimento de fármacos dirigidos (targeted drugs) tem sido ineficaz. Uma abordagem alternativa para o desenvolvimento de analgésicos seria o desenvolvimento de triagens comportamentais baseadas em modelos animais de baixo custo, alto rendimento e sem alvo, que modelam comportamentos nociceptivos complexos nos quais os compostos analgésicos são testados. Investigações recentes demonstraram que



peixes teleósteos possuem nociceptores, receptores para detectar estímulos potencialmente dolorosos, que são muito semelhantes aos encontrados em mamíferos. Neste contexto, o zebrafish (*Danio rerio*) tem sido proposto como uma alternativa simples e de baixo custo em relação ao uso de vertebrados superiores em estudos sobre novos compostos com potencial antinociceptivo. O zebrafish é atualmente o modelo alternativo mais promissor devido à sua similaridade genética com humanos ( $\pm 70\%$ ), facilidade de manuseio e manutenção em comparação a outros modelos, como roedores. Além disso, o zebrafish é o vertebrado não mamífero mais frequentemente usado como modelo de estudo para diversas doenças humanas e vários estudos apontam para o seu potencial como um modelo de nocicepção. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver e validar um modelo comportamental em zebrafish capaz de induzir respostas nociceptivas específicas e facilmente manipuladas em ensaios de bioprospecção de novas moléculas e fármacos antinociceptivos, visando acelerar o processo, reduzir custos, fornecer informações complementares e diminuir a demanda por vertebrados superiores. Para isto, avaliaremos a toxicidade em embriões e larvas de zebrafish após a exposição a compostos pró-inflamatórios (ácido acético e prostaglandina E2) e antinociceptivos (crotalina e morfina). Em seguida, determinaremos a resposta comportamental nociceptiva e o efeito dos compostos analgésicos sobre esta resposta em larvas e zebrafish adultos, usando software especializado e contagens de crossover de câmara adaptada, respectivamente.

**Apoio financeiro:** CNPq

### **30- Papel da aldeído desidrogenase 2 na neuroinflamação induzida por constrição crônica do nervo isquiático**

Alcantara Q.A.<sup>1</sup>, Santa-Cecilia F.V.<sup>1</sup>, Ferreira J.C.<sup>2</sup>, Mochly-Rosen D.<sup>3</sup>, Cury. Y.<sup>1</sup>, Zambelli V.O.<sup>1</sup>

1- Laboratório Especial de Dor e Sinalização (LEDS), Instituto Butantan, Brasil; 2- Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil; 3- Chemistry and Systems Biology, Stanford University, CA, USA

Aldeído-desidrogenase 2 (ALDH2) é uma enzima mitocondrial que metaboliza aldeídos reativos. O acúmulo de aldeídos tem sido relacionado a dor. Nosso grupo mostrou que a ativação da ALDH2, usando uma pequena molécula denominada Alda-1, induz efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção inflamatória e neuropática e esse efeito é decorrente da redução de aldeídos reativos como o 4-hidroxinonal e acetaldeído no local da lesão. Apesar dessas evidências, não sabemos até o presente momento qual a origem desses aldeídos na vigência de lesão tecidual. Sabe-se que as células gliais e macrófagos participam ativamente da gênese e manutenção da nocicepção, porém a contribuição destas células na síntese desses aldeídos é desconhecida. Assim, nosso objetivo é investigar o papel do ALDH2 na neuroinflamação periférica induzida pela lesão crônica da constrição (CCI). Para tanto, utilizamos camundongos C57/BL selvagens e



ALDH2\*2, ou seja, portadores de uma mutação que confere perda da atividade da ALDH2. A hiperalgesia neuropática induzida pelo modelo de constrição crônica do nervo isquiático (CCI). A Alda-1 foi administrada por meio de mini bomba osmótica sob a dose de 16mg/kg/dia. O limiar nociceptivo foi avaliado pelo método de Von Frey Eletrônico. Os experimentos foram conduzidos sob aprovação do Comitê de Ética do Instituto Butantan (7044040219). Os resultados demonstraram que a CCI promoveu diminuição no limiar nociceptivo dos animais (~36%) quando comparado com a medida basal (hiperalgesia) no período de 7 e 14 dias após a cirurgia. A administração de Alda-1 reverte a hiperalgesia induzida pela CCI em animais selvagens (~98%). Animais falso-operados não apresentaram alteração no limiar por todo o período de observação, enquanto que animais heterozigotos ALDH2\*1/2 apresentaram diminuição do limiar nociceptivo (~30%) no período de 14 dias. Análises histológicas do nervo isquiático indicam sinais de degeneração walleriana no aspecto da fibra, no período de 14 dias em grupos submetidos à CCI, quando comparado com os nervos coletados de animais Sham e naïve, cuja estrutura celular foi mantida. Esses resultados parciais sugerem que danos e/ou alterações nos axônios periféricos e nos tipos celulares alvo deste estudo contribuem para as mudanças comportamentais observadas no modelo de dor neuropática.

**Apoio financeiro:** CNPq

### **31- Determinação da estrutura gênica de serino proteases do veneno de *Bothrops jararaca* e *B. erythromelas***

Lotto N.P.<sup>1</sup>, Picon N.T.P.<sup>2</sup>, Santoro M.L.<sup>2</sup>, Oguiura N.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Ecologia e Evolução; 2- Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

O veneno da serpente *Bothrops jararaca* apresenta diversas toxinas com atividade coagulante, tais como as serinoproteinases (SVSP) que possuem atividade fibrinogenolítica e são capazes de clivar o fibrinogênio de forma similar à trombina. Por outro lado, a *B. erythromelas*, serpente responsável pelo maior número de acidentes ofídicos no estado de Pernambuco, apesar do seu veneno apresentar atividade coagulante, não possui atividade trombina símile. Estudos anteriores feitos por nosso grupo mostraram que a falta de atividade trombina símile nas *B. erythromelas* é resultante da deleção total ou parcial do gene, enquanto que em uma *B. jararaca* sem atividade trombina símile no veneno, esta é consequência de mutações pontuais e pequenos indels na sequência gênica. Estes resultados indicam que o gene inicialmente é inativado por pequenas mutações e essa morte pode levar à deleção de sequências maiores. Para determinarmos a estrutura de um gene funcional da serinoproteinase na *B. jararaca*, novos venenos foram testados para escolhermos serpentes com atividade trombina-símile no veneno para deduzirmos a sua estrutura. O objetivo deste trabalho é determinar a estrutura gênica da serinoproteinase trombina-símile de *B. jararaca* utilizando PCR. O teste de coagulação foi feito no Laboratório de Fisiopatologia do



Instituto Butantan. Foi medido o tempo necessário para coagular ou o plasma bovino ou o fibrinogênio utilizando diferentes concentrações de veneno, estes dados foram usados para calcular a “Dose Mínima Coagulante” (DMC). A sequência genômica foi amplificada por PCR usando primers desenhados a partir das regiões conservadas das SVSP trombinsímile dos genes e transcritos de *B. atrox*, *B. jararaca* e *B. insularis* utilizando a polimerase PfuUltra II Fusion HS. Foram feitos testes de coagulação em seis novos venenos de *B. jararaca*, estes apresentaram atividade trombinsímile cuja DMC variou de 10 a 275 µg/mL de veneno. O DNA genômico dessas serpentes foram purificados a partir de diferentes tecidos. Os seis genomas foram utilizados como molde para os ensaios de PCR, mas apenas duas reações apresentaram amplificados em torno de 7 kpb (tamanho estimado para o gene que codifica a serino proteinase). Essas bandas foram purificadas a partir do gel de agarose para possibilitar a clonagem e posterior sequenciamento desses fragmentos. Autorizações: CEUAIB 1349-14, CEUAIB 8094050216, CEUA-FMVZ 1726060917.

**Apoio financeiro:** FAPESP 2015/00003-5, Award AALAC 2015 e Fundação Butantan.

### 32- Caracterização dos efeitos da JarC nativa e recombinante sobre células endoteliais

Souza F.B.J.<sup>1</sup>, Ferraz K.F.<sup>1</sup>, Shimokawa-Falcão L.H.<sup>1</sup>, Caporrino M.C.<sup>1</sup>, Della-Casa M.S.<sup>1</sup>, Silva-Mendonça R.<sup>1</sup>, Magalhães G.S.<sup>1</sup>, Clissa P.B.<sup>1</sup>

1 - Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

A Jararagina-C (JarC) é uma proteína obtida a partir do veneno de *Bothrops jararaca*, formada pelos domínios tipo-disintegrina e rico em cisteína, derivada da autólise da jararagina, uma metaloproteinase de classe PIII. A JarC possui capacidade de modular positivamente a migração de células endoteliais, sugerindo um possível papel no processo de angiogênese. O processo angiogênico está envolvido em diversos distúrbios, como por exemplo, o câncer e a degeneração macular, porém esse mesmo processo é fundamental para a resposta imune e o reparo de tecidos. A rJarC é uma forma recombinante da JarC, obtida utilizando-se o vetor pSUMOUlpl. Experimentos preliminares sugerem que esta proteína recombinante apresente a estrutura conformacional e a atividade cicatrizante “in vitro” preservada, quando comparada à Jar nativa. O objetivo deste trabalho foi purificar a proteína nativa e expressar e purificar a proteína recombinante. Também comparamos os efeitos das duas proteínas na viabilidade de 2 linhagens de células endoteliais humanas derivadas do cordão umbilical (HUVEC): linhagem CC-2159TM (linhagem primária-Lonza) e CRL-1730TM (linhagem imortalizada-ATCC). Foram realizados ensaios de viabilidade utilizando-se a técnica do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Foi utilizada uma proteína recombinante não relacionada, a GFP, como controle inespecífico. O processo de obtenção da proteína nativa, analisado por eletroforese em SDS/PAGE, demonstrou uma proteína praticamente pura, mas apresentando alguns resquícios de contaminante com a massa molecular idêntica à da jararagina. Em vista disso a JarC foi tratada com inibidor de metaloproteinase, O-



Phenantrolina 20mM, para neutralizar o efeito proteolítico do contaminante, pois poderia interferir nos ensaios com as células endoteliais. Assim nossos resultados indicam que a JarC recombinante e nativa (tratada ou não com O-Phe) não apresentaram toxicidade sobre as duas linhagens de células endoteliais. Diante da ausência de toxicidade, os próximos experimentos irão avaliar a capacidade destas proteínas induzirem proliferação a migração de células endoteliais in vitro. Nossos resultados até o momento indicam que as duas proteínas não apresentam toxicidade sobre células endoteliais.

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan.

### **33- Expressão e purificação da região de alfa-hélice de variantes da proteína PspA (Pneumococcal surface protein A)**

Araujo A.P.<sup>1</sup>, Miyaji E.N.<sup>1</sup>.

1- Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, Brasil.

*Streptococcus pneumoniae* é responsável por doenças como otite média, sinusite, pneumonia, bacteremia e meningite. As vacinas conjugadas polissacarídicas são baseadas na indução de anticorpos contra o polissacarídeo capsular e provaram ser muito eficazes na prevenção de infecções invasivas causadas por pneumococos em crianças. Indivíduos não vacinados também mostraram uma diminuição na doença pneumocócica devido ao efeito de rebanho. No entanto, houve uma rápida substituição de colonização da nasofaringe e de doença por sorotipos não-vacinais. Os idosos continuam sendo um grupo particularmente afetado, com alta incidência de pneumonia pneumocócica. Pneumococcal surface protein A (PspA) é encontrada em todos os isolados de pneumococos. Essa proteína atua na interação entre o patógeno e o hospedeiro, interferindo na ativação e na deposição de fatores do sistema complemento na superfície da bactéria. Sua estrutura possui um domínio de ligação à colina na região C-terminal; próximo a este domínio existe uma região rica em prolina e na região N-terminal há um domínio  $\alpha$ -hélice que é exposto na superfície bacteriana. PspA apresenta variabilidade na região em  $\alpha$ -hélice, sendo classificada em 6 clados. Não se sabe se a diminuição da imunidade a qualquer antígeno pneumocócico específico estaria relacionada à alta suscetibilidade dos idosos. Trabalhos anteriores mostraram evidências de que níveis mais baixos de anticorpos anti-PspA podem estar relacionados a essa suscetibilidade aumentada. O objetivo deste projeto é expressar a região de  $\alpha$ -hélice N-terminal madura de PspA dos clados 1 a 6. Os fragmentos que codificam PspA1 $\alpha$ , PspA2 $\alpha$  e PspA3 $\alpha$  foram amplificados por PCR utilizando uma polimerase Taq de alta fidelidade e subclonados no vetor pGEM-TEasy e, em seguida, clonados no vetor pAE para expressão em *Escherichia coli* DE3 Star pLysS. As proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* com uma cauda de poli-histidina, purificadas utilizando colunas de afinidade com níquel e analisadas por SDS-PAGE. A partir de uma cultura inicial de 300 mL, foram obtidos 18 mg de PspA1 $\alpha$ , 28 mg de PspA2 $\alpha$  e 28 mg de PspA3 $\alpha$ . Os próximos passos são expressar e





purificar PspA4 $\alpha$ , PspA5 $\alpha$  e PspA6 $\alpha$ . Em seguida, as proteínas recombinantes serão usadas para avaliar se existem diferenças nos níveis de anticorpos anti-PspA no soro entre adultos jovens e idosos e se existe alguma correlação entre os níveis de anticorpos e proteção contra o desafio da colonização.

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan.

### **34- Purificação do Fator Estimulador de Colônia de Granulócito Humano Recombinante (rhG-CSF)**

Mascarelli D.E.<sup>1</sup>, Gonçalves V.M.<sup>1</sup>, Barazzone G.C.<sup>1</sup>

#### 1- Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas

O Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF) estimula e regula a proliferação, sobrevivência, nível e diferenciação de neutrófilos. O G-CSF humano recombinante (rhG-CSF) é um produto biotecnológico utilizado no tratamento da neutropenia. A peguilação, ligação do polietilenoglicol (PEG) com biomoléculas é geralmente utilizada para aumentar o tempo de meia-vida plasmática. O objetivo deste trabalho é a purificação de rhG-CSF a partir da biomassa previamente produzida em *E. coli* para posterior peguilação. 100g de biomassa congelada foi ressuspensa em 1L de tampão de lise (Tris 10 mM, NaCl 50 mM, pH 8, 0,1% de Triton X-100, EDTA 1mM e PMSF 1 mM). A lise celular foi efetuada em um homogeneizador contínuo de alta pressão. O material lisado foi centrifugado e os corpos de inclusão (CI) obtidos lavados com solução Tris 20mM, NaCl 50mM e ureia nas concentrações de 1, 2 e 3M. Após a lavagem com ureia 3M a amostra foi dividida em duas partes com 22g de massa úmida cada, para a realização da purificação em duas etapas. Os CIs obtidos foram ressuspensados em Tris 20mM, NaCl 50 mM, 5 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, ureia 8 M, pH 8,0. Após 16h a ressuspensão foi centrifugada (11.000 g, 2h a 4° C). O sobrenadante foi renaturado por diluição direta em tampão Tris 20 mM, EDTA 2mM, Triton X-100 0,1% e glicerol 10% em pH 8 (1ml/min). Após 18h, a solução foi diluída para concentração final de ureia 0,6M. A proteína de interesse foi purificada por cromatografia de troca aniônica em resina Q-Sepharose. O tampão de equilíbrio usado foi Tris 30mM, NaCl 50mM, pH 8,0. As eluições foram realizadas em Tris 30mM e com 100, 200, 350, 500 e 1000 mM de NaCl em pH 8. As frações contendo a rhG-CSF foram coletadas e uma nova etapa de purificação efetuada com cromatografia de troca catiônica (SP-Sepharose). O tampão de equilíbrio usado foi acetato de sódio 20 mM, NaCl 50 mM, pH 5. As eluições foram feitas com acetato de sódio 20mM com etapas de NaCl 100, 200, 350, 500 e 1000 mM em pH 5. O conteúdo proteico de todas as etapas foram quantificados pelo método colorimétrico BCA e as frações analisadas por eletroforese SDS-PAGE (gel 20%). A pureza relativa da rhG-CSF foi determinada por densitometria das bandas do gel de eletroforese. Resultados: Após a renaturação e centrifugação obtivemos 346,5 mg de proteínas totais sendo a pureza relativa da rhG-CSF igual a 31,5%. A cromatografia em Q-Sepharose foi realizada com eluição da proteína nas frações 2, 3 e 4. Na F2 obteve-se 6,15 mg de proteínas totais com



62,4% de rhG-CSF, em F3, 17,51 mg com 55,8% de pureza relativa e a fração 4, 4,57 mg com 64,3% de rhG-CSF. Foi feito um pool das frações 2-4, ajustado o valor da condutividade e pH e o pool foi injetado na SP-Sepharose. Os resultados dessa etapa de purificação estão sendo analisados. A rhG-CSF foi anteriormente purificada com pureza relativa de 84,6 %, porém a recuperação da mesma foi baixa.

**Apoio financeiro:** CNPq.

### **35- Uso de célula tronco imatura de polpa dentária humana como estratégia de imunomodulação na anemia aplásica adquirida.**

Policiquio B.O.<sup>1</sup>, Gonzaga V.F.<sup>1,2</sup>, Wenceslau C.V.<sup>2</sup>, Kerkis I.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Genética, Instituto Butantan; 2- CellAvita Ltd, São Paulo, Brasil.

A anemia aplásica (AA) é uma doença rara, um tipo de síndrome de falência medular, causada por agressões na medula óssea (MO) levando à hipocelularidade medular, e consequentemente à pancitopenia no sangue periférico. Uma das principais causas da AA é a autoimunidade, esse processo ocorre no resultado de desequilíbrio entre as células T CD8+ e CD4+, incluindo células T auxiliares (Th) tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2), células T reguladoras (Treg) e tipo 17 (Th17), células natural killer (NK), levando à morte das células hematopoiéticas e suas precursoras. A busca por novas alternativas terapêuticas para as doenças hematológicas vem crescendo continuamente, sendo comum a utilização de transplante de células tronco mesenquimais (CTM). Em 2006 Kerkis e colaboradores isolaram a da polpa dentária células tronco semelhantes às CTM, denominando-as células de células tronco imaturas de polpa dentária humana (CTIPDh). Como conhecido, as células tronco mesenquimais (CTM), apresentam propriedades imunomoduladoras o que conferem o seu potencial em inibir a resposta imune. Estudos pré-clínicos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa utilizando o modelo animal de aplasia de medula óssea demonstrou que as CTIPDh são uma fonte terapêutica em potencial para o tratamento da AA. O projeto teve como objeto avaliar as propriedades imunomodulatórias da CTIPDh no modelo animal de AA induzida por irradiação, através da dosagem de citocinas posterior a terapia celular (Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, processo número 8373040817).

**Apoio financeiro:** CNPq.

### **36- Avaliação ex vivo da eficácia inibitória de peptídeos sobre enzimas trombina símile**

Ebram M.C.<sup>1</sup>, Silva G.M.<sup>1</sup>, Andrade S.A.<sup>1</sup>

1- Laboratório Especial de Dor e Sinalização Celular, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Devido ao alto grau de ocupação em diversos habitats, sobretudo na América do Sul, as serpentes do gênero *Bothrops* apresentam um grande interesse científico, pois são as maiores causadoras de acidentes ofídicos nessa parte do mundo, resultando em



amputações e mortes. Diante dos fatos que no Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan o índice de acidentes por *Bothrops* chega a 97,5% dos pacientes tratados e que a soroterapia com o soro antiofídico, atual tratamento para acidentes com esse gênero, apesar de eficaz na neutralização das metaloproteinases, não anula totalmente a atividade de serinoproteinases como as enzimas trombina símile, estudos relacionados a esse gênero são importantes para geração e/ou melhoria de antídotos, melhor entendimento/solução dos problemas de saúde pública e de conservação ecológica. As enzimas trombina-símile, representantes das serinoproteinases (SVSP) e segunda classe de enzimas mais abundante no veneno de *Bothrops jararaca*, agem em diversos pontos da cascata de coagulação humana. Esta classe de enzima possui uma tríade catalítica altamente conservada (Ser195, His57 e Asp102) em posições análogas às serinoproteinases de mamíferos. Essas proteinases apresentam por volta de 40% de similaridade com a trombina endógena humana, mas apesar da semelhança estrutural, o mesmo não se aplica à especificidade pelos substratos. Essas toxinas, de modo similar à trombina humana, reconhecem e hidrolisam o fibrinogênio. Contudo, a hidrólise ocorre exclusivamente na cadeia alfa, liberando apenas o fibrinopeptídeo A. Além disso, essas toxinas não ativam o fator XIII, fundamental para a formação de uma rede de fibrina estável. Conseqüentemente, há a formação de uma rede de fibrina instável e susceptível à ação do sistema fibrinolítico humano (Koh DCI, 2006), que pode resultar em e/ou agravar um quadro hemorrágico. Nosso grupo transformou quimicamente substratos reconhecidos e hidrolisados por enzimas trombina-símile presentes no veneno de *Bothrops jararaca* em inibidores peptídicos. Também avaliou in vitro a estabilidade e a ação inibitória desses peptídeos (denominados A e B) frente ao veneno de *B. jararaca*, a batroxobina, trombina símile oriunda do veneno de *B. moojeni* e a algumas serinoproteinases da coagulação sanguínea humana. Portanto, esse projeto visa avaliar em plasma de camundongos a eficácia inibitória desses peptídeos frente à ação do veneno de *Bothrops jararaca* na coagulação sanguínea e na agregação plaquetária. Para tanto, testes globais de coagulação sanguínea, tais como tempo de trombina, tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcialmente ativada e testes de agregação plaquetária, usando plasma pobre e rico em plaquetas respectivamente serão realizados na presença e na ausência dos inibidores peptídicos.

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan.

### **37- Análise do sistema renina angiotensina (SRA) em duas famílias de serpentes brasileiras**

Marinho J.L.<sup>1</sup>, Perussi A.P.<sup>1</sup>, Nascimento T.G.<sup>1</sup>, Diagon M.M.R.Q.<sup>1</sup>, Dianesi M.S.<sup>1</sup>, Breno M.C.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

A angiotensina II (AngII) tem função importante no controle cardiovascular de vertebrados interagindo, em mamíferos, com os receptores AT1 e AT2. Entretanto, na



aorta da serpente *Bothrops jararaca* (Bj -família Viperidae) foi observada a presença de um receptor para AngII (AngIIR) insensível aos antagonistas seletivos para o receptor AT1 e AT2, e a presença de uma enzima conversora de angiotensina (ECA) ativa. O objetivo deste trabalho é caracterizar o perfil farmacológico e a sinalização intracelular ativada pelo AngIIR no músculo liso vascular, aorta, de outras serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Cdt, cascavel, Viperidae) e *Oxyrhopus guibei* (Og, falsa coral, Colubridae), bem como avaliar a presença de ECA tecidual. Cdt e Og, ambos os sexos, vindas da natureza, mantidas em biotério (12h claro/escuro; 21-27°C; 65% umidade) foram anestesiadas (pentobarbital sódico, 30 mg/Kg, intracelômica) e eutanasiadas (C.Ética 1691061115/9738030616). Curvas cumulativas concentração-efeito para AngI e AngII foram obtidas em anéis de aorta isolada de Og e Cdt na ausência e na presença, de acordo com protocolo experimental, do inibidor da ECA (captopril); do antagonista do receptor AT1 (losartan); de três inibidores da proteína quinase C (PKC - queleretrina, GF109203x, UCN-01). Foi também avaliada a influência de fatores liberados do endotélio na resposta para AngII em ambas as serpentes. Captopril (10-6M) deslocou à direita a curva para AngI (Og - pD2 6,9 para 5,9; n=6; Cdt - pD2 7,6 para 6,9, n=5), mas não para AngII. Losartan (> 10-6M) deslocou à direita a curva para AngII em aorta de Og (pKb 4,7 n=2) e Cdt (pKb 4,15 n=6). Os inibidores da PKC, queleretrina (10-5M - pD2 6,7 n=4) e UCN-01 (10-6M pD2 6,5 n=6) não modificaram o efeito da AngII na aorta da Cdt, mas GF109203x (10-5M n=4) reduziu o efeito máximo. A remoção do endotélio em aorta de Cdt não modificou o efeito vasoconstritor para AngII (pD2 6,4 para 6,7 n=6). Resultados relativos à PKC e à remoção do endotélio em Og ainda são preliminares (n=2). Discussão: Detectou-se no vaso de Og e de Cdt a presença de ECA tecidual ativa e receptor com alta afinidade para Ang II, embora farmacologicamente distinto do AT1 descrito em mamíferos. Este perfil para o SRA é similar ao observado em *B.jararaca*. Há o envolvimento de alguma isoforma de PKC na sinalização intracelular ativada pelo AngIIR na aorta de Cdt, tal como em mamíferos e na Bj, e a remoção do endotélio não modificou a vasoconstrição da AngII nessa serpente. O SRA tem função biológica relevante de peixes até humanos, tanto positivas na fisiologia cardiovascular, como deletérias relacionadas com patologias cardio-circulatórias de humanos. Particularmente entre os répteis, vertebrados que fizeram a transição do ambiente aquático para terrestre, necessitando ajustar a dinâmica cardiovascular à força gravitacional no meio terrestre, o SRA endógeno é importante para a viabilização da vida desses répteis. Esse estudo contribui para compreender o SRA em vertebrados.

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan.

### **38- Uma abordagem de Bioinformática e Biologia de Sistemas no estudo desempenhado por CD90 em câncer de mama triplo negativo**

Batista M.L.S.<sup>1,2,3,4</sup>, Lobba A.R.M.<sup>1</sup>, Sogayar M.C.<sup>1,2</sup>, A. C. O. Carreira A.C.O.<sup>1,5</sup>, M. Y. Nishiyama-Jr<sup>4</sup>

1-NUCEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular), Departamento de Clínica Médica, USP; 2-Instituto de Química, USP; 3- Curso de Ciências Moleculares, USP; 4- Laboratório de



Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan; 5- Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo, Brasil.

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado entre mulheres no mundo, sendo o tipo triplo-negativo ductal-invasivo (TNBC-Triple Negative Breast Cancer) o mais agressivo e letal. O gene CD90/Thy-1, marcador de células-tronco mesenquimal, foi identificado como um alvo promissor associado com um mau prognóstico em pacientes TNBC e envolvido em vários processos celulares que levam à transformação maligna, tais como: alteração morfológica, transição epitélio-mesênquima (TEM), aumento da proliferação celular, invasividade, metástase e ativação da via do EGFR. Para elucidar as relações entre as vias de sinalização alteradas pelo gene CD90, utilizamos a tecnologia de RNA-seq para análise do perfil transcriptômico num modelo de linhagens de mama triplo negativo, utilizando a linhagem celular de mama MCF10A (não-maligna) superexpressando CD90 (MCF10A/CD90+) e a linhagem Hs578T (maligna) silenciada para CD90 (Hs578T/shCD90), em comparação com suas respectivas linhagens parentais. Para tanto, desenvolvemos um pipeline para a identificação de Genes Diferencialmente Expresso (DEGs) usando o software edgeR com Fold Change = 3 e P-valor = 0.01. Os dados foram divididos em três conjuntos para as análises de enriquecimento, denominados Up, Down e All (Up+Down). A análise de enriquecimento foi baseada no EnrichR, utilizando os bancos (KEGG e Reactome) com os genes DEGs e no software GSEA (Gene-set Enrichment Analysis) com os níveis de expressão diferencial. Selecionamos 134 genes e 66 vias canônicas relacionadas a TNBC, a partir da literatura, para comparar e integrar com as análises deste trabalho. Para refinamento dos dados, adotamos o banco Reactome como referência, por apresentar vias mais específicas e relacionadas ao câncer de mama. Para identificar as vias de sinalização contendo genes co-regulados, com mínimos efeitos individuais em seu nível de expressão, utilizamos o GSEA, baseado no banco de vias canônicas. A análise da linhagem MCF10A/CD90+ identificou 12 genes regulados positivamente e 2 genes regulados negativamente. No enriquecimento utilizando o GSEA, com score de enriquecimento NES (Normalized Enrichment Score) > 0,5 e, baseado em 7 vias de sinalização curadas, identificamos uma alteração positiva para as vias de sinalização de TGF $\beta$ , VEGF, AKT, componentes metabólicos, hipóxia, e TEM, corroborando com o comportamento sistêmico do câncer ao adicionar o gene CD90, envolvido com a progressão da malignidade. Na análise da linhagem Hs578T/shCD90 foram encontradas as mesmas vias de sinalização alteradas, entretanto, com um perfil de expressão oposto (NES negativo, < 0,5), corroborando com a mudança de fenótipo observado nas células no respectivo modelo. Redes de correlação ponderada usando o software WGCNA serão utilizadas para avaliar as interações entre as vias de sinalização e os genes visando integrar os resultados biológicos a uma abordagem de Biologia de Sistemas, a fim de elucidar o mecanismo envolvido na alteração fenotípica no modelo de câncer de mama via CD90.

**Apoio financeiro:** CNPq.



### **39- Metaloproteinase hemorrágica HF3 do veneno de *B. jararaca*: interação com células endoteliais circulantes, obtenção do HF3 recombinante e do domínio DC com mutações sítio-dirigidas**

Ferreira J.A.<sup>1</sup>, Cajado-Carvalho D.<sup>1</sup>, Trevisan-Silva D.<sup>1</sup>, Menezes M.C.<sup>1</sup>, Serrano S.M.T.<sup>1</sup>

1- Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada – CeTICS, Instituto Butantan, Brasil

O processo inflamatório culmina em eventos celulares mediados pelas células endoteliais e leucócitos. As células endoteliais são importantes alvos das enzimas de venenos e as metaloproteinases de veneno de serpentes (SVMPs) desempenham um papel relevante na resposta inflamatória observada no envenenamento. É descrito que a metaloproteinase hemorrágica HF3 isolada do veneno de *B. jararaca* através de suas ações catalítica e anti-adesivas induz a degradação de proteínas que compõem a membrana basal, as interações entre célula-matriz e célula-célula, resultando na ruptura dos vasos capilares, causando extensa hemorragia. Contudo, interações específicas entre o HF3 e células endoteliais não foram descritas. Diversos trabalhos mostram que os domínios tipo-disintegrina e rico em cisteínas das SVMPs estão envolvidos nas interações dessas enzimas com ligantes específicos. Recentemente, os domínios tipo-disintegrina (D) e rico em cisteínas (C) do HF3 foram obtidos utilizando o sistema de expressão livre de células. Os resultados mostraram que as proteínas recombinantes foram capazes de interagir com proteínas da matriz extracelular, além de modular a clivagem do fibrinogênio pelo HF3. Porém, os resíduos de aminoácidos desta metaloproteinase importantes para tais atividades ainda não são conhecidos. O objetivo deste trabalho é analisar a interação do HF3 nativo com proteínas de membrana de células endoteliais de sangue periférico, obtenção da forma recombinante do HF3 e dos seus domínios DC mutantes utilizando um sistema de expressão livre de célula derivado de *E. coli*. As sequências do HF3 e dos seus domínios não catalíticos (DC/WT e DC mutantes) foram clonados no vetor de expressão pIVEX. Para a expressão das proteínas HF3, DC/WT, e dos mutantes DC/MUT-Ácido e DC/MUT-Básico, uma expressão em pequena escala foi utilizada para otimizar as condições da reação, como as concentrações de magnésio, potássio, e as condições redox. As reações foram incubadas a 30° C com agitação por 16h. As células endoteliais de sangue periférico (BOECs) foram obtidas a partir da coleta de sangue e isoladas por gradiente de Ficoll. O cultivo foi mantido até o aparecimento das células endoteliais ( $\pm 20$  dias). Após esse período, as células foram lisadas e as proteínas de membrana foram isoladas por ultracentrifugação. A interação do HF3 com as proteínas de membrana de BOEC foi analisada por ensaio de ligação em fase sólida. Resultados: As proteínas recombinantes HF3, DC/WT, e DC/MUT-Básico, foram expressas em pequena escala e após estabelecidas as melhores condições de expressão foram obtidas com sucesso e identificadas por anticorpos anti-histag em ensaios de western-blot. As etapas de purificação estão em fase de otimização. O resultado do ensaio de ligação em fase sólida, mostrou que o HF3 nativo interage com as proteínas de membrana de BOECs de



forma concentração dependente. A identificação das proteínas de membrana que interagem com HF3 será realizada por espectrometria de massas.

**Apoio financeiro:** FAPESP.

#### **40- Ação do 5-azacytidine (5-azaC) na redução da oviposição e alteração da expressão gênica em *Schistosoma mansoni***

Olberg G.G.O.<sup>1</sup>, Maciel L.F.<sup>1</sup>, Silveira G.O.<sup>1,2</sup>, Verjovski-Almeida S.<sup>1,2</sup>, Amaral .S.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan; 2- Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

O *Schistosoma mansoni* é o trematódeo responsável por causar a esquistossomose no Brasil, uma doença tropical negligenciada que afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo. De ciclo de vida heteroxeno, o *S. mansoni* tem como hospedeiro intermediário caramujos do gênero *Biomphalaria*, que abriga os miracídios, os quais após completarem sua reprodução dentro do molusco são expelidos como cercarias, forma humano-infectante. Quando adultos, os parasitas encontram-se nas veias mesentéricas dos humanos podendo causar sintomas como fezes sanguinolentas, diarreia e hepatoesplenomegalia. O desenvolvimento de novos compostos para o tratamento da esquistossomose e a busca de novos alvos terapêuticos são necessários visto que o praziquantel, única droga utilizada para o controle da doença, tem sido relatada com o desenvolvimento de resistência. O 5-azacytidine (5-AzaC) é um agente que causa desmetilação do DNA capaz de reduzir a oviposição do *S. mansoni*, alterar o desenvolvimento ovariano e a maturação dos ovos, bem como interferir na expressão gênica de vermes tratados. RNAs longos não codificadores de proteínas (lncRNAs) são RNAs transcritos com mais de 200 nucleotídeos e que têm pouco ou nenhum potencial para codificação de proteínas. lncRNAs têm sido envolvidos em diversos processos biológicos em diferentes organismos, e muitos deles têm sido propostos como alvos terapêuticos em doenças neurodegenerativas e câncer. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, in vitro, o efeito do 5-AzaC frente à capacidade ovipositora do *S. mansoni* e identificar os níveis de expressão de lncRNAs após o tratamento com 5-AzaC. Esse processo pode estar diretamente ligado a sua ação inibitória da metilação na região promotora do DNA, e pode indicar lncRNAs possivelmente regulados que podem representar novos alvos farmacológicos. Para tanto, vermes adultos de *S. mansoni* foram tratados ou não com 5-AzaC por 48 h, período após o qual os ovos foram contados, os vermes foram coletados e tiveram o seu RNA extraído. Reações de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) foram realizadas para avaliação dos níveis de lncRNAs após o tratamento com 5-AzaC. Observamos uma redução de 57% na postura de ovos de vermes tratados com 5-AzaC em relação ao controle. O tratamento com 5-AzaC levou a diferenças significativas na expressão gênica de lncRNAs e genes codificadores de proteínas testados, indicando possível regulação direta pela metilação do DNA. Entre os lncRNAs diferencialmente expressos, estão 495 lincRNAs intergênicos, 324 lncRNAs



antisense e 25 lncRNAs sense. Essa é a primeira evidência de lncRNAs regulados por drogas em *S. mansoni* até o momento, e o estudo dos lncRNAs possivelmente regulados por metilação no DNA pode indicar novos alvos farmacológicos. CEUA Nº: 1777050816

**Apoio financeiro:** FAPESP

#### **41- Ciclo e comportamento reprodutivo de *Chironius bicarinatus* (Serpentes, Colubridae)**

Araújo G.S.<sup>1</sup>, Almeida-Santos S.M.<sup>1</sup>, Lobo L.M.<sup>2</sup>, Migliore S.N.<sup>2</sup>

1- Laboratório de Ecologia e Evolução, Instituto Butantan; 2- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, PPG em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

A serpente *Chironius bicarinatus* pertence à família Colubridae, e está amplamente distribuída na região da Mata Atlântica. O estudo da biologia reprodutiva desta espécie indica que sejam animais sazonais, com período reprodutivo no outono, mas dentro da mesma espécie podem ocorrer variações no ciclo reprodutivo tanto de machos como de fêmeas. Esta pesquisa teve finalidade de descrever o ciclo reprodutivo e associar o dimorfismo sexual ao comportamento reprodutivo desse grupo, através da descrição do comportamento de ritual de combate entre machos e análises das diferenças morfológicas de tamanho entre machos e fêmeas. Através das medidas de comprimento rostro cloacal (CRC), comprimento relativo caudal (CC) e comprimento da cabeça (CCAB), coletadas de 14 espécimes de *Chironius bicarinatus*, foi possível obter resultados preliminares de que há dimorfismo sexual no tamanho de machos e fêmeas da mesma espécie, onde machos apresentam comprimento relativamente maior que as fêmeas. Observou-se também que os combates registrados correspondem com a estação reprodutiva. O dimorfismo sexual é resultante da seleção sexual, que favorece machos de tamanho corporal maior, pois são privilegiados nas espécies que apresentam combate. Podemos deduzir que a evolução se deu selecionando positivamente essa característica nos machos, que atingem tamanhos maiores para a disputa com outro macho rival. Geralmente esses combates estão associados ao período reprodutivo da espécie e parece haver forte associação entre dimorfismo sexual e o ritual de combate. Entretanto, será necessário um “n” amostral maior para analisar as gônadas histologicamente para chegar a resultados mais robustos, e inferir se o comprimento (CRC) dos machos está relacionado aos rituais de combate e ao ciclo reprodutivo desta espécie.

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan





#### **42- Três modelos de estresse com diferentes bases neurais: reflexos sobre a atividade cerebral regional e correlação com a depressão**

Cabbia V.M.<sup>1</sup>, Schwerz J.P.<sup>1</sup>, Ramos A.T.<sup>1</sup>, Troncone L.R.P.<sup>1</sup>.

Doenças psiquiátricas têm sido relacionadas a experiências de estresse. A obtenção de modelos animais para o estudo de doenças como o Transtorno da Depressão Maior (TDM) tem grandes limitações, e o uso de estressores é um dos modelos para seu estudo. Esses modelos devem seguir critérios de isomorfismo, validade preditiva e equivalência das bases neurobiológicas, as quais são pouco conhecidas. Este trabalho tem como objetivo a investigação das bases neurais envolvidas em diferentes categorias de estresse (físico, psicológico e misto), em diferentes janelas temporais, e sua correlação com o TDM. Para isso, ratos Wistar machos foram submetidos a três tipos de estresse (inalação de vapor de éter, contenção e nado forçado) com posterior investigação das áreas cerebrais que apresentaram alteração na taxa metabólica a partir do consumo de [14C] 2-Deoxi-Glicose, em condição aguda, além de imuno-histoquímica para a expressão da proteína Fos, para avaliar as consequências em uma janela de tempo mais ampla.

**Apoio financeiro:** CNPq

#### **43- Obtenção de crotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e fragmentos de crotoxina para análise da atividade moduladora sobre células dendríticas**

Pereira, D.R.<sup>1</sup>, Távora B.C.L.F.<sup>1</sup>, Sciani, J.M.<sup>2</sup>; Sampaio S.C.V.<sup>3</sup>; Faquim- Mauro E.L.<sup>1,4</sup>.

1- Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan; 2- Universidade São Francisco, Bragança Paulista; 3- Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan; 4- Departamento de Imunologia-ICB, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

É descrito que o veneno de *Crotalus durissus terrificus*, sua principal toxina, crotoxina (CTX), assim como sua subunidade fosfolipásica (CB) exercem efeito modulador sobre o sistema imune inato. A célula dendrítica (DC) é um elemento da imunidade inata essencial para a indução da imunidade adaptativa contra agentes patogênicos, e também, participa dos mecanismos de tolerância periférica. Sendo assim, temos estudado o potencial modulador da CTX e CB sobre as DCs e verificamos que ambas são capazes de inibir a maturação de DCs incubadas com lipopolissacarídeo (LPS). O objetivo do trabalho é avaliar se a atividade fosfolipásica da CTX é essencial para sua ação moduladora sobre as DCs e se fragmentos de maior massa molecular da CTX exercem efeito sobre a maturação das DCs induzida por ligantes de TLRs. **Materiais e Métodos:** A CTX foi purificada a partir de amostras do veneno de *C.d.terrificus*, por cromatografia líquida de troca iônica, utilizando a coluna Mono-Q 5/50 GL. As amostras purificadas foram corridas em gel de poliacrilamida 12%, para a verificação da pureza das amostras. As amostras de CTX foram submetidas à digestão com tripsina e os fragmentos foram purificados por cromatografia



liquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC). Os experimentos usando camundongos foram aprovados pelo CEUAIB nº 6912050517. Para a diferenciação das DCs, foram extraídas células indiferenciadas da medula óssea de camundongos BALB/c. A diferenciação foi feita sob a presença de IL-4 e GM-CSF. Após 7 dias, as células foram incubadas por 18h com LPS ou Poly-IC. Após a incubação, o sobrenadante foi coletado para a análise das citocinas secretadas e a maturação das DCs foi analisada por citometria de fluxo, usando os anticorpos marcados com fluorocromos anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86 e anti-MHC classe II. Foram feitas 10 corridas cromatográficas, das quais obtivemos 8,668 mg/mL de CTX. Após a digestão da CTX com tripsina foram escolhidos os picos 5 e 7. As análises feitas por citometria de fluxo mostraram que o LPS e Poly-IC induziram a maturação das DCs aumentando a expressão de MHC II, CD40, CD80 e CD86. Do sobrenadante recolhido, foi possível observar a produção de IL-6 indicando a maturação eficiente dessas células. Esses resultados permitirão a realização dos experimentos futuros referentes ao estudo do efeito modulador da CTX e fragmentos sobre a atividade funcional das DCs.

**Apoio financeiro:** CNPq

#### **44- Modulação da GST-INS, uma disintegrina recombinante do veneno de *Bothrops insularis*, na expressão de ICAM-1 por células de melanoma na presença de plaquetas**

Bastos-do-Nascimento A.B.<sup>1</sup>, Silva-Mendonça R.<sup>1</sup>, Magalhaes G.S.<sup>1</sup>, Clissa P.B.<sup>1</sup>, Della-Casa M.S.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Durante a progressão tumoral, as plaquetas contribuem muito para angiogênese, crescimento tumoral e metástase via proteínas transmembranas, as integrinas. A integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , expressa na superfície das plaquetas e a integrina  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ , expressa em células tumorais, principalmente melanomas, modulam adesão celular, migração, sobrevivência e crescimento celular. Além disso, as moléculas como ICAM-1, tem sido alvo importante de estudo na modulação de fenótipo pro-metastático. A disintegrina recombinante obtida do veneno da serpente *Bothrops insularis*, a insularina, GST-INS, age inibindo a agregação plaquetária e a adesão de plaquetas com células tumorais, atuando de forma simultânea sobre as integrinas  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  e  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ , respectivamente. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão gênica da molécula de adesão ICAM-1 em células de melanoma SK-MEL-28 co-cultivadas na presença de membranas plaquetárias e avaliar a participação da GST-INS na modulação desse fenômeno. **Materiais e Métodos:** A membranas plaquetárias foram obtidas a partir do PRP (plasma rico em plaquetas) de



sangue total de doadores saudáveis a partir de centrifugações e posterior choque térmico (37°C e PBS a 4°C). Para o ensaio de expressão genica por PCR Real Time, as células SK-Mel-28 foram incubadas na presença de membranas plaquetárias e das proteínas GST-INS ou GST (proteína controle). Após a incubação, foi realizado a extração do RNA total das amostras e o produto da reação foi submetido à transcrição reversa para a obtenção do cDNA. Os ensaios preliminares de expressão gênica, obtidos por PCR real time, demonstraram que as membranas de plaquetas parecem estimular a expressão genica de ICAM-1 nas células SK-Mel-28 e que a GST-INS estaria modulando negativamente essa expressão, diferentemente da GST, que não apresentou interferência na expressão dessa molécula. Esses resultados podem sugerir a participação das plaquetas na alteração do fenótipo das células SK-MEL-28, sendo a GST-INS uma importante ferramenta para estudos envolvendo moléculas de adesão no contexto de migração tumoral.

**Apoio financeiro:** FAPESP

#### **45- O veneno da serpente *Bothrops moojeni* estimula pré-adipócitos e induz a liberação de mediador inflamatório envolvido na resposta local ao veneno.**

Teixeira D.S.<sup>1</sup>, Borges G.I.<sup>1</sup>, Maia-Marques R.<sup>1</sup>, Leiguez E.<sup>1</sup>, Teixeira C.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas constituem um importante problema de Saúde Pública em regiões tropicais do mundo e estão incluídos entre as doenças negligenciadas. Os venenos botrópicos, apesar de apresentarem diferenças na sua composição, induzem, de um modo geral, um quadro fisiopatológico caracterizado por reações sistêmicas (coagulopatias) e locais imediatas (edema, mionecrose, hemorragia e dor). O tecido adiposo branco de mamíferos é constituído principalmente por adipócitos, que além de serem responsáveis pela reserva energética do organismo, participam da síntese de uma grande variedade de citocinas e mediadores lipídicos. Deste modo, este tecido está também associado a diversos processos fisiopatológicos relevantes, como a obesidade e artropatias. A ação das enzimas ciclooxigenase-1 (COX-1) e -2 (COX-2) sobre os ácidos graxos acarreta a síntese de prostanoídes, como a prostaglandina E2 (PGE2). Considerando a importância do tecido adiposo na síntese de mediadores inflamatórios, os estudos voltados para as ações de venenos ofídicos em células que compõem este tecido e sua contribuição para o envenenamento ofídico são relevantes. O objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos do veneno bruto de *B. moojeni* (VBm) quanto às ações e mecanismos relacionados à síntese de mediadores lipídicos em pré-adipócitos murinos da linhagem 3T3-L1. Para a determinação da viabilidade celular, pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1 foram cultivados até a confluência, em meio de Cultura DMEM suplementado com 10 % de SFB. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM suplementado com 0,2 % de BSA e estimuladas com o VBm, nas concentrações de 0,5, 1,



5 ou 10  $\mu\text{g/mL}$ . A atividade metabólica dos pré-adipócitos foi avaliada pelo método da redução do MTT após cada período de incubação das células com 0,5, 1, 5 ou 10  $\mu\text{g/mL}$  de VBm (1-24 h). A integridade celular foi avaliada pelo método do cristal violeta. Para a quantificação da liberação de PGE<sub>2</sub>, foi realizado ensaio imunoenzimático. Os resultados demonstram que o VBm, nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ , foi citotóxico para os pré-adipócitos, a partir da terceira hora de incubação. Nas concentrações de 0,5 e 1  $\mu\text{g/mL}$ , o veneno não alterou a viabilidade nem a integridade de membrana celular. Portanto, a concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$  foi escolhida para os ensaios posteriores. A incubação dos pré-adipócitos com o VBm (1  $\mu\text{g/mL}$ ), resultou na liberação de PGE<sub>2</sub>, que foi significativa em relação aos controles após 12 e 24h, mas não entre 1 e 6h. Os resultados obtidos demonstram pela primeira vez a capacidade do VBm estimular pré-adipócitos para a liberação de PGE<sub>2</sub> um importante mediador de vários processos inflamatórios, incluindo a resposta local ao veneno botrópico. Além disso, estes resultados apontam o tecido adiposo como uma fonte importante de mediadores inflamatórios durante o envenenamento por VBm.

**Apoio financeiro:** CNPq

#### **46- A liberação de TNF- $\alpha$ induzida pela metaloproteínase BaP1 em macrófagos é dependente da enzima conversora de TNF- $\alpha$ (TACE)**

Caires G.A.<sup>1</sup>, Alves M.M.<sup>1</sup>, Verardo C.V.<sup>1</sup>, Gutiérrez J.M.<sup>2</sup>, Teixeira C.<sup>1</sup>, Fernandes C.M.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil; 2- Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

As metaloproteinases são enzimas abundantes em venenos de serpentes da família Viperidae e são relevantes para a fisiopatologia do envenenamento, por suas ações hemorrágicas e inflamatórias. Estas metaloproteinases de venenos (MVs) apresentam homologia estrutural e funcional com as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) e as ADAMs, de mamíferos. A ADAM-17 ou TACE (enzima conversora de TNF- $\alpha$ ) é responsável pela liberação da forma ativa de TNF- $\alpha$  a partir de seu precursor. A partir do veneno da serpente *Bothrops asper* foi isolada a MV BaP1, com 22,7 kDa e fraca ação hemorrágica, contendo apenas o domínio catalítico. Foi demonstrado que a BaP1 induz importantes eventos inflamatórios in vivo e a liberação de mediadores inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ . Entretanto, os mecanismos envolvidos no processamento de TNF- $\alpha$  pela BaP1 não foram esclarecidos. Este estudo é parte de um projeto integrado, que visa investigar os mecanismos moleculares envolvidos na produção e liberação de TNF- $\alpha$ , induzida pela BaP1, em macrófagos, as principais células do sistema imune inato. O objetivo deste trabalho é Investigar o efeito de BaP1 em macrófagos murinos, da



linhagem Raw 264-7, em relação a: (i) expressões gênica e proteica da ADAM-17 e (ii) a participação da ADAM-17 na liberação de TNF- $\alpha$ . Os macrófagos ( $1 \times 10^6$ ) foram incubados com BaP1 (12,5 $\mu$ g / mL) ou meio de cultura RPMI (controle), pré-tratados ou não com o inibidor da ADAM-17 (TAPI-1, 20 $\mu$ g/mL, durante 1 hora) e a liberação de TNF- $\alpha$  foi avaliada pelo ensaio de citotoxicidade sobre células L929. A BaP1 induziu a liberação de TNF- $\alpha$  por macrófagos, em todos os períodos de tempo estudados (entre 5 min e 24 h) (8813 $\pm$ 750 pg/mL), atingindo o pico máximo na 6<sup>a</sup> hora (24200 $\pm$ 1010 pg/mL), em comparação aos controles (150 $\pm$ 24 pg/mL). Em adição, a incubação das células com TAPI-1 resultou na inibição da liberação de TNF- $\alpha$ , induzida pela BaP1, na 3<sup>a</sup> hora de incubação. Os dados obtidos demonstram 1) a capacidade da BaP1 induzir a liberação de TNF- $\alpha$  por macrófagos e 2) que este efeito é dependente da ativação da ADAM-17. Esta é a primeira demonstração de que uma MV é capaz de ativar, direta e/ou indiretamente, a ADAM-17 para a liberação de TNF- $\alpha$ .

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan

#### **47 - Avaliação do perfil combinatório da citotoxicidade e peroxidação lipídica em células de melanoma B16-F10 tratadas com o monoesterlipídico fosfoetanolamina e a potencialização do tratamento com quimioterápico Dacarbazida.**

Maltez M.<sup>1</sup>, Carlstron J.P.<sup>1</sup>, Rabelo D.<sup>1</sup>, Alves R.C.B.<sup>1</sup>, Maria D.A.<sup>1</sup>

1- Laboratório de Biologia Molecular, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

Antineoplásicos fosfolipídicos (alquilfosfolipídios sintéticos), diferentemente dos antineoplásicos convencionais, não tem como alvo o DNA das células, mas sim as membranas celulares, às quais eles se inserem. Fosfoetanolamina, um éster fosfórico cujo grupo R corresponde a -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, foi isolada em 1936 por Outhouse, de tumores malignos bovinos e está presente literalmente em todos os tecidos e órgãos animais. É precursora da fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (dois dos principais componentes da membrana plasmática), o segundo lipídio mais abundante em mamíferos e apresenta diversas funções importantes na fisiologia celular. Evidências indicam que a assimetria dos fosfolipídeos é perturbada nos estágios precoces da apoptose como um mecanismo fundamental para o reconhecimento das células apoptóticas e eliminação pelos macrófagos. Estudos em uma grande variedade de células tumorais tratadas com fosfoetanolamina levaram a uma redução expressiva da massa tumoral, redução da formação de metástases, induzindo a morte celular por apoptose e sem afetar a capacidade proliferativa de células normais. Objetivo Demonstrar os efeitos de citotoxicidade e formação de espécies reativas de oxigênio no tratamento em linhagens de melanoma B16F10 com fosfoetanolamina sintética e formulação lipossomal DODAC/FOS, e a potencialização do tratamento de B16F10 com o quimioterápico Dacarbazida. **Materiais e Métodos** As células de melanoma murino da linhagem B16F10 foram tratadas



com fosfoetanolamina sintética(Phos), em diferentes concentrações por 24 horas, após a avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo método colorimétrico com MTT (com a determinação da concentração inibitória (IC50%)) e a avaliação de espécies reativas de oxigênio foi realizada por ensaio de produção de radicais lipoperoxidados (LPO). Processo realizado também, utilizando a associação ao tratamento com diferentes doses do quimioterápico Dacarbazida DTIC . Resultados e Discussão Os resultados dos ensaios de células B16F10 tratadas com Phos demonstraram uma concentração inibitória de 35,96 mM e LPO IC50% de 10,33  $\mu$ M, o ensaio com DODAC demonstrou uma concentração inibitória de 2,006 mM (potencialização = 17,93x) e LPOIC50% de 7,95  $\mu$ M, o ensaio com DODAC/Phos demonstrou uma concentração inibitória de 1,493 mM (potencialização = 24,09x) e LPOIC50% de 11,87  $\mu$ M. A produção de radicais lipoperoxidados foi inversamente proporcional ao aumento da resposta proliferativa, o que é um indutor dos efeitos moduladores da resposta ao fosfolípídeo, fosfoetanolamina sintética. O uso Phos demonstrou ser um bom potencializador sinérgico no tratamento com dacarbazida.

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan

#### **48 - Fisiologia molecular comparativa da digestão em aranhas e relação veneno/fluido digestivo.**

Valladão, R.<sup>1,2</sup>, Gonzaga, M.O.<sup>3</sup>, Lopes, A.R<sup>1</sup>

1- Laboratório de Bioquímica, Instituto Butantan; 2- Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo; 3- Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

Durante um período de mais de 400 milhões de anos, as aranhas apresentam uma infinidade de peptídeos no veneno que são usados para captura de presas e/ou defesa contra predadores, peptídeos de defesa do hospedeiro envolvidos na imunidade inata, bem como enzimas para digerir suas presas e nutrição. A inoculação do veneno e a regurgitação do líquido digestivo podem ocorrer simultaneamente, onde há alguma discussão sobre o envolvimento do veneno e do fluido digestivo na digestão das presas. Uloboridae, conhecidas como aranhas que tecem teias em formato orbicular, não possuem glândulas de veneno. Em vez disso, elas envolvem suas presas completamente em seda, cobrindo-a com enzimas digestivas regurgitadas e depois ingerem o corpo e a seda liquefeitos. Com base em nossos dados anteriores sobre enzimas digestivas de aranhas, nós medimos bioquimicamente várias enzimas no intestino médio isolado (MD) de *Uloborus* sp. Nosso objetivo é a identificação bioquímica das carboidrases, lipases e peptidases envolvidas no processo digestivo da aranha *Uloborus* sp e a comparação com dados sobre enzimas digestivas de *Nephila*, *Nephilingis* e *Loxosceles*. As aranhas foram imobilizadas e dissecadas sob estereomicroscópio. Ensaios enzimáticos foram realizados a 30° C em tempo adequado e condição de pH para cada enzima. Os produtos da reação enzimática foram medidos por fluorescência ou absorvância em Gemini XPS e Spectramax 190, respectivamente. O MD isolado foi homogeneizado individualmente em água ultra-



---

filtrada (Milli Q). Lipase (DMPTB),  $\alpha$ -L-fucosidase (metilumbeliferil  $\alpha$ -L-fucopiranosídeo), quitinase (metil umbeliferil-quitotriosídeo), hexosaminidase (metilumbeliferil-N-acetilglucosamina), amilase (Amido), astacina (caseína-FITC), catepsina-L (Carbobenzoxi-Fe-Arg-7amido4metil cumarina), atividade de aminopeptidase (Leu-p-nitroanilida) e atividade de carboxipeptidase (CarbobenzoxiGlyPhe) foram utilizados como substratos. *Uloborus* sp MD apresentou atividade de todas as enzimas testadas, com uma atividade proeminente de catepsina-L, uma peptidase ácida. Como observado anteriormente para outras espécies de aranhas, a catepsina-L está presente como um zimogênio na aranha MD e precisa de uma ativação ácida. Embora *Uloborus* sp seja bem menor que as aranhas *Nephilidae*, a atividade específica medida para peptidase e quitinase é semelhante ou até maior em Uloboridae que em outras aranhas. No entanto, a quantidade de metalopeptidase parece ser significativamente menor em *Uloborus*, em comparação com *Loxosceles*, o que pode estar relacionado à recuperação enzimática e ao estágio de alimentação.

**Apoio financeiro:** Fundação Butantan.