

4º ENCONTRO DOS ALUNOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DO INSTITUTO BUTANTAN



**A importância da Ciência
Dinâmica e Plural nos
Dias Atuais**

**28
jun**

RNAs longos não-codificadores de proteínas regulados por inibidores de enzimas modificadoras da cromatina em *Schistosoma mansoni*

Kayque L. S. C. Lima¹, Ana Carolina Tahira¹, Pablo Q. F. da Motta¹, Sergio Verjovski-Almeida^{1,2}, Murilo S. Amaral¹

¹Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil

²Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Introdução. O *Schistosoma mansoni* é um trematódeo responsável por causar a esquistossomose, doença tropical negligenciada que afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo. O desenvolvimento de novos compostos para o tratamento da esquistossomose e a busca de novos alvos farmacológicos são necessários, visto que a única droga utilizada para o controle da doença, o praziquantel, tem sido relacionada com o desenvolvimento de resistência pelos parasitas e é ineficaz contra as formas jovens. Uma das classes de novos possíveis alvos farmacológicos é a de RNAs longos não codificadores de proteínas (lncRNAs), que podem desempenhar importantes papéis na modulação da cromatina e que têm sido propostos como alvos farmacológicos em doenças humanas. Outra classe é a das enzimas modificadoras da cromatina (EMC), proteínas capazes de regular a expressão gênica das histonas que se ligam ao DNA. Neste contexto, recentemente nosso grupo avaliou a eficácia do tratamento *in vitro* sobre *S. mansoni* de quatro compostos que alvejam EMC específicas, denominados TH65 (inibidor da histona deacetilase HDAC8), GSK343 (inibidor da histona metiltransferase EZH2), e MC3935 e TB7/36 (inibidores da histona demetilase LSD1). Foi observado que, após os tratamentos, houve uma forte diminuição da viabilidade dos parasitas, além de significativas alterações no tegumento, drástica redução na oviposição e alterações na expressão gênica. Neste projeto, pretende-se avaliar a expressão diferencial de lncRNAs após o tratamento *in vitro* de *S. mansoni* com os inibidores citados.

Métodos. Os dados de RNA-Seq de parasitas tratados com os 4 inibidores gerados previamente pelo nosso grupo foram reanalisados, agora incluindo lncRNAs além de mRNAs. O alinhamento das sequências foi realizado com o programa STAR, a contagem com RSEM e a identificação de genes diferencialmente expressos (DE) com dois algoritmos: limma+voom e edgeR+svaseq. Apenas os genes encontrados em comum nas duas análises foram utilizados. Para validação de lncRNAs encontrados como DE, *primers* foram desenhados usando o programa Primer3web versão 4.1.0 e parasitas adultos foram cultivados *in vitro* em meio ABC contendo DMSO (veículo) ou TH65 a 20µM. A viabilidade, pareamento e oviposição foram avaliados durante esse tratamento, e vermes foram coletados para a extração de RNA.

Resultados. O RNA-seq resultou em uma média de 18,2 milhões de sequências por amostra. Análises de expressão gênica diferencial identificaram 159, 9, 81 e 48 lncRNAs DE em fêmeas e 70, 25, 107 e 84 lncRNAs DE em machos nos tratamentos com TH65, GSK343, MC3935 e TB7/36, respectivamente, o que corresponde em média a 5-12% de todos os transcritos DE. *Primers* foram desenhados para validação por RT-qPCR de 15 lncRNAs DE selecionados em vermes adultos após tratamento com os diferentes compostos. A eficiência média calculada para os primers foi de 95,5%. Após tratamento com TH65 a 20µM, os parasitas adultos tiveram 75% e 85% de redução na viabilidade e oviposição, respectivamente.

Conclusão. As análises confirmam que um grande número de lncRNAs possuem sua expressão afetada em parasitas adultos expostos aos 4 compostos inibidores de EMCs. Experimentos de RT-qPCR estão sendo realizados para validar a expressão diferencial de lncRNAs selecionados. Esse estudo vai permitir indicar lncRNAs como novos possíveis alvos farmacológicos em *S. mansoni*.

Suporte financeiro: FAPESP, CNPq e Fundação Butantan

Comparison between *Crotalus durissus ssp.* adult and senile snake venoms

Igor Castellar-Sorrila, Nathália da Costa Galizio, Caroline Serino-Silva, Beatriz Kopel, Jarbas Prado Vidueiros, Kathleen Fernandes Grego, Karen de Morais-Zani, Anita Mitico Tanaka-Azevedo

Aging causes metabolism changes in different organisms such as snakes. However, studies that analyze these changes are scarce, especially those that evaluate differences in composition and function of snake venoms. For this reason, this work aims to understand the distinctions about *Crotalus* adult senile venom, and understand possible differences in venom composition and the effects caused by snakebites. This study used *Crotalus durissus collilineatus* (Cdc) and *Crotalus durissus cascavella* (Cdv) snake venoms of different ages. For this, it was selected three Cdv individual venoms, one adult and two senile, and twelve Cdc individual venoms, seven adults and 5 senile. It was considered senile snakes over eight years old. Venoms were analyzed through protein quantification, according to Bradford's method (1976); L-amino-acid oxidase (LAAO) activity, according to Kishimoto and Takahashi (2001); Phospholipase (PLA₂) quantification and Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). All assays were performed using individual venom samples and in experimental triplicate. LAAO activity was observed in both species, and senile individuals show slightly more activity than adults. This is a nice result and observation for our study. In the next step, PLA₂ activity was analyzed, but the results were different comparing with LAAO. There was no significant changes observed, independently the age and the specie. After that, SDS-PAGE was performed and the gels showed an important difference: the crotamine. This protein wasn't observed on Cdv venoms but appears on Cdc venoms. Subsequently, Western Blotting was performed, and it was possible to observe a good reaction in the tests without Beta and in the older ones. In addition, azocazein proteolytic activity tests were also performed, obtaining clear results that the activities in adults were greater than in the seniles. Finally, the High-performed liquid chromatography (HPLC) test was finished, and the results are still in the final stage of discussion and comparison. At the moment, the Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test is in the process and in the final phase of results analysis. This result is it compatible with other in the literature. For the next steps, it will be made: fibrinogenolysis and minimal coagulant dose, aiming to understand the Cdc and Cdv snake venom changes during the life. The authors gratefully the financial support by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) with Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

Keywords: Aging, senile, adults, *Crotalus*

Histona H2BV: análise do seu papel no empacotamento da cromatina de Trypanosoma cruzi através da técnica de CHIP-Loop

Rubia Diaz Taveiros Kühne^{1,2} , Natália Karla Bellini^{1,2} e Julia Pinheiro Chagas da Cunha ^{1,2}

1 Laboratório de Ciclo Celular, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

2 Centro de Toxinas, Resposta-imune e Sinalização Celular (CeTICS), Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

Email: rubia.kuhne@esib.butantan.gov.br

Palavras-chave: CHIP-Loop, *Trypanosoma cruzi*, H2BV.

Os tripanossomas apresentam estrutura genômica e regulação gênica muito peculiar, uma vez que sua transcrição é policistrônica e não são conhecidos sítios promotores de RNA polimerase II, sendo sua regulação majoritariamente pós-transcricional. A cromatina em *T. cruzi*, assim como os demais eucariotos, contém nucleossomos compostos por duas cópias de cada tipo de histona H4, H3, H2A e H2B. Porém estudos revelaram a presença de histonas variantes (ex: H2B.V) que conferem alterações na estrutura e função dos nucleossomos aumentando a complexidade da cromatina. Ensaios de Chip-seq realizados em nosso grupo demonstraram enriquecimento de H2B.V nas regiões dSSRs (*divergent strand switch regions*), próximas aos loci de tRNA, e entre regiões *conserved* e *disruptive*. Propusemos, portanto, avaliar o papel da H2B.V no empacotamento da cromatina em regiões alvo do genoma, e investigar seu possível papel na regulação gênica através da técnica de Chip-loop. Assumimos a hipótese de que a H2B.V promova a formação de loops aproximando dSSRs adjacentes. Experimentalmente, o método de Chip-loop consiste na combinação entre a técnica de CHIP e a de 3C (*Chromatin conformation capture*). Esta envolve o cross-link de células com formaldeído, digestão da cromatina com enzimas de restrição, ligação destes fragmentos de DNA, imunoprecipitação usando um anticorpo contra a proteína de interesse e análise de qPCR (Polymerase Chain Reaction in Real Time) dos produtos ligados representando as interações tridimensionais entre locis genômicos próximos. Selecionamos duas regiões de interesse para desenho dos primers: dSSRs acompanhadas de um cluster de tRNA codirecional próximo, e um alvo complementar contendo dSSRs próximas sem a presença de tRNA. Utilizamos *T.cruzi* CL Brener cuja H2BV foi previamente tagueada com MYC em nosso laboratório. Após análise in silico para escolha da enzima de restrição selecionamos DpnII, e diferentes concentrações dela estão sendo avaliadas para obtenção de fragmentos da cromatina entre 300-700 bp. Em paralelo, estamos realizando adaptações na técnica de CHIP, incluindo métodos de lise do parasita, além de confirmações da eficácia do protocolo através de *Western Blot* e PCR. Uma vez estabelecida a técnica do CHIP, os próximos passos envolvem a padronização da

ligação dos fragmentos de DNA e a quantificação do DNA quimera por qPCR representando as interações que ocorrem no genoma.

Suporte Financeiro: CnPq e FAPESP.

Knockdown do lincRNA *PVT1* Oncogênico Diminui Proliferação de Células de Câncer de Próstata em Linhagem Celular

Aluno: Gabriel Nakanishi Fortes

Orientadora: Dra. Maria Gabriela Berzoti Coelho

Co-orientador: Dr. Sérgio Verjovski-Almeida

Laboratório: Laboratório de Expressão Gênica em Eucariotos

Introdução: O câncer de próstata (PCa) é o segundo tipo de câncer mais diagnosticado em homens e, atualmente, corresponde a principal causa de morte relacionada a câncer no sexo masculino. O desenvolvimento do PCa é altamente dependente do receptor de andrógeno (AR), um fator de transcrição que medeia o efeito dos hormônios androgênicos e modula a transcrição de genes em células da próstata, promovendo sua ativação ou inibição. A terapia de privação androgênica pode suprimir o PCa, no entanto o AR pode sofrer alterações e se manter ativo mesmo em condições de privação hormonal. Os RNA longos não codificadores (lncRNAs), compostos por 200 ou mais nucleotídeos, estão associados ao desenvolvimento de câncer, uma vez que a desregulação de lncRNAs parece impactar funções celulares como proliferação, apoptose e indução de metástases. Estudos anteriores de nosso grupo revelaram que o lncRNA *PVT1* está ligado ao AR em células LNCaP de PCa, sugerindo que o *PVT1* está envolvido em um programa repressivo transcricional dependente de andrógeno, levando à inibição de genes supressores de tumor.

Materiais e Métodos: A linhagem celular LNCaP foi transfectada com lentivírus para *knockdown* do *PVT1*, usando o sistema *CRISPR-Cas13d*. O nível da expressão gênica foi detectado por PCR quantitativo (RT-qPCR). Para o teste de proliferação celular, células controle ou *knockdown* (sg #13.4 or sg #17.10) foram plaqueadas em placas de 6 poços e o teste de exclusão por Trypan Blue foi executado diariamente, por 6 dias, para contar o número de células coradas ou não coradas. Os resultados foram normalizados com a contagem das células no dia zero. **Resultados e Conclusões:** O *knockdown* do *PVT1* foi confirmado por RT-qPCR e resultou em diminuição da proliferação das células *knockdown* em comparação com o controle. Os resultados confirmam que o *PVT1* age como oncogênico em câncer de próstata e sugerem que tal lincRNA poderia funcionar tanto como um biomarcador quanto como um candidato para um alvo terapêutico no tratamento do câncer de próstata.

Suporte financeiro: CNPq e FAPESP (Processo 2021/13698-2).

Título: Estudo das aranhas do grupo *negro* no gênero *Alpaida* O. Pickard-Cambridge, 1889 (Araneae: Araneidae)

RESUMO

O tema deste projeto é verificar se o acasalamento proposto para espécie *Alpaida negro* Levi, 1988 está correto. Esta espécie pertence a um grupo de espécies, aqui denominado grupo *negro* e é representado pelas espécies afins, *Alpaida acuta* (Keyserling, 1891) e *A. moata* (Chamberlin & Ivie, 1936). Detectamos que macho e fêmea examinados na coleção do Instituto Butantan (IBSP) diferem em relação ao casal proposto originalmente. Sendo assim, farto material desta espécie da coleção do IBSP vai ser examinado e comparada com os espécimes originais. As relações com as duas outras espécies do grupo também serão avaliadas num contexto morfológico, com base nas estruturas genitais.

São Paulo, SP

2022

ALTERAÇÕES DO CITOESQUELETO DE ASTRÓCITOS, GLIOBLASTOMAS U138 E NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS INDUZIDAS PELA B-MICRUSTOXINA, FOSFOLIPASE A₂ ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE *MICRURUS LEMNISCATUS*.

Caio Henrique Tida Oliveira, Elisa Micaela Costa Ferreira, Maria Regina Lopes Sandoval, Solange Castro Afeche.

Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan.

Introdução: As fosfolipases A₂ (FLA₂) são um conjunto de enzimas que catalisam a hidrólise dos glicofosfolipídeos da membrana plasmática, convertendo-os em ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Estas enzimas, quando presentes nas toxinas de venenos de serpentes da família Elapidae, atuam diretamente nos neurônios pré-sinápticos da junção neuromuscular, extravasando todo o neurotransmissor presente na vesícula da célula, neste caso a acetilcolina. Dados obtidos em nosso laboratório mostraram a redução da divisão celular de astrócitos e da viabilidade de glioblastomas U138 quando incubados com a β -micrustoxina, do veneno de *Micrurus lemniscatus*. Há trabalhos mostrando que alterações no citoesqueleto celular podem levar à ativação de p53 e a uma parada no ciclo celular. Este trabalho tem por objetivo caracterizar as alterações no citoesqueleto induzidas pela β -micrustoxina, uma FLA₂ isolada do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus*, em astrócitos, glioblastomas U138 e neurônios hipocampais em cultura. **Métodos:** Para a obtenção da cultura de astrócitos foram isoladas glândulas pineais de 8 ratos machos Wistar. As glândulas foram submetidas à dissociação com a enzima papaína e os astrócitos foram cultivados em garrafas de cultura. Para a obtenção dos neurônios foi realizada a retirada dos hipocampus dos fetos de ratas, no 19º dia de gestação. Os neurônios foram obtidos por proteólise com a enzima tripsina e foram cultivados em placas para microscopia confocal, contendo a solução de polilisina. Os glioblastomas U138 foram adquiridos da ATCC. Os astrócitos e os glioblastomas foram cultivados em meio DMEM com 10% de SFB e os neurônios em meio Neurobasal e suplemento B27 em estufa à 37°C com 5% de CO₂. As células foram expostas à β -micrustoxina, 2nM e 20nM, por 24h e, subsequentemente, marcadas com 500nM e 100nM, para aquisição em time-lapse, do fluoróforo SiR-Actina. Na sequência a análise das imagens foi realizada por microscopia confocal. **Resultados:** Foram observados efeitos decorrentes da exposição dos glioblastomas às diferentes concentrações da toxina, como a diminuição do citosol, estreitamento do citoesqueleto, porém nos astrócitos alterações evidentes não foram identificadas. Parece também ter havido um aumento da presença de fragmentos celulares nos glioblastomas expostos as toxinas. **Conclusão:** A β -micrustoxina parece induzir alteração no citoesqueleto de actina em glioblastomas U138, mas não em astrócitos. A correlação entre alterações no citoesqueleto com a redução da viabilidade observada em glioblastomas ainda precisa ser esclarecida.

Suporte financeiro: Bolsa de Iniciação Científica, Fundação Butantan.

Projeto: Análise do conteúdo proteico e enzimático dos venenos e do sistema digestório de *Nephilingis cruentata* ao longo dos processos de ressíntese após a alimentação

Aluna: Isabelle Alencar da Silva Rodrigues

Orientador: Adriana Rios Lopes

Introdução: Aranhas são a maior ordem de Arachnida (± 45.000 espécies) ocupando quase todos os ambientes terrestres e são os predadores mais importantes de insetos. Pelo fato de alguns insetos serem vetores de doenças ou pragas agropecuárias, a compreensão de seus predadores pode resultar no desenvolvimento de estratégias de controle contra estes organismos. Entretanto, muito da fisiologia molecular das aranhas ainda não foi caracterizada, como a ressíntese proteica do veneno após o consumo deste na captura de suas presas, bem como das enzimas que participam do processo digestivo.

Objetivos: Estudar o efeito dos intervalos de alimentação e jejum na síntese de enzimas nas aranhas *Nephilingis cruentata* pela caracterização das atividades das principais enzimas digestivas.

Material e métodos: Fêmeas de *Nephilingis cruentata* foram dissecadas para isolar o sistema digestório (SD), as quais foram mantidas em jejum por um período de 15 dias após a coleta ou alimentadas com *Gryllus sp.* O material dissecado foi utilizado para ensaio das enzimas: aminopeptidase, amilase, fucosidase, serino peptidase, hexosaminidase, dentre outras, eletroforese em géis de poliacrilamida para separação das proteínas e zimografias utilizando gelatina como substrato e separação cromatográfica. *Gryllus sp* previamente pesados cujo exoesqueleto foi removido foram homogeneizados para quantificação de proteína total por peso total dos animais para estabelecimento de peso médio e estimativa de quantidade proteína média, além de homogeneizados dos detritos restantes de grilo após a alimentação da aranha.

Resultados e Conclusão: Nas amostras de *Nephilingis cruentata* alimentada e em jejum, foi possível observar que há uma maior atividade de todas as enzimas testadas nos animais alimentados. Esse resultado é distinto do esperado, pois os animais em jejum já devem ter as suas células com vesículas de secreção repletas de enzimas para o próximo processo de alimentação. Uma das hipóteses possíveis é de que as enzimas presentes na amostra de jejum precisem passar por um processo de pré ativação. Outro ponto a se destacar é com relação às amostras de detritos restantes de *Gryllus sp*, há uma atividade muito maior do que nas amostras de grilo inteiro e do intestino da aranha, tendo um indicativo de que a atividade medida nesses resíduos seja de restos de fluído da aranha. Para testar essa hipótese será necessário realizar as medidas também no fluido. A separação em eletroforese das amostras de detritos de *Gryllus* e homogeneizado do intestino de aranha com padrões de bandas distintos, bem como as zimografias e a separação por cromatografia de afinidade em benzamidina-sepharose.

Suporte financeiro: Bolsa PIBIC (CNPq)

Título do projeto: Acoplamento das unidades catalítica e regulatória do proteassomo após mutações sítio-específicas

Nome da aluna: Natália Mori Avellaneda Penatti

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Demasi

Laboratório: Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan

Introdução: Em leveduras da espécie *S. cerevisiae*, o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Marilene Demasi descreveu uma modificação redox pós-traducional denominada S-glutationilação em resíduos Cys da subunidade $\alpha 5$ da unidade catalítica 20S do proteassomo, em especial o $\alpha 5$ -C76 e o $\alpha 5$ -C221, posteriormente mutadas para $\alpha 5$ -C76S e $\alpha 5$ -C221S. As linhagens carregando essas mutações apresentaram como alteração fenotípica um menor tempo de vida cronológico (CLS: chronological life span) e uma maior frequência da conformação fechada da câmara catalítica da unidade 20S. Uma dupla mutação randômica na subunidade $\alpha 5$ ($\alpha 5$ -S35P/C221S) induziu a abertura da câmara catalítica do 20S e também aumentou o CLS da célula. Neste trabalho, nos propusemos a estudar se as discrepâncias do CLS entre as linhagens estudadas devem-se a diferenças de acoplamento entre a unidade catalítica 20S e a unidade regulatória 19S do proteassomo. Ademais, avaliamos a funcionalidade mitocondrial dessas linhagens, visto que a funcionalidade mitocondrial depende do acoplamento entre as unidades do proteassomo para a manutenção do adequado controle de qualidade de proteínas dessa organela.

Métodos: As linhagens WT, C76S e S35P/C221S do *S. cerevisiae* foram cultivadas em meio rico YPG (Yeast extract 1%, Peptone 2%, Glycerol 2% / etanol 2%) , tratadas com a enzima zimoliase para remoção da parede e posterior lise. O estudo do acoplamento das unidades 20S-19S foi feito em gel nativo a partir de extrato celular da levedura. Para determinar a funcionalidade mitocondrial, foi feita até o momento a avaliação da atividade da citrato sintase mediante a reação de ácido ditionitrobenzóico (DTNB) com CoA-SH.

Resultados: 1) Observou-se que a linhagem C76S apresentou uma quantidade muito menor de proteassomos 26S e 30S quando comparada às demais linhagens.

2) A atividade da citrato sintase da linhagem C76S apresentou-se bastante diminuída em comparação com as outras linhagens.

3) Os pellets mitocondriais da C76S apresentaram tamanho reduzido e cor pálida esbranquiçada, enquanto os pellets das outras linhagens eram de cor acastanhada.

Conclusões: A partir dos resultados obtidos, concluímos que o menor CLS da linhagem C76S está acompanhado de um menor acoplamento entre as unidades 20S e 19S do proteassomo, provavelmente causado por uma disfuncionalidade mitocondrial evidenciado pela baixa atividade da citrato sintase e pelos pellets mitocondriais esbranquiçados, fato que sugere alguma alteração na citocromo C.

Suporte financeiro: PIBIC-CnPQ

Avanços na Predição de Peptídeos Bioativos Antivirais e Estruturas 3D por Redes Neurais

Laboratório de Toxinologia Aplicada - LETA
Orientador - Milton Yutaka Nishiyama-Jr

Aluna de IC
Letícia Carvalho Eustáquio Costa

Colaboradores
Caio Fontes de Castro
Fernanda Midori

Introdução

O interesse por Peptídeos Bioativos tem crescido devido à sua presença nos seres vivos e seu potencial para produção de novos fármacos com menor probabilidade de desenvolvimento de resistência, especialmente aqueles com ação antiviral, que podem ser alternativas aos antivirais tradicionais, que muitas vezes apresentam efeitos adversos aos pacientes. Este projeto é uma continuidade do desenvolvimento do preditor de Peptídeos Bioativos Antivirais (EnAVP) aplicado às proteínas de organismos venenosos em especial os Aracnídeos, visando diminuir o tempo e custo de prospecção desses compostos, devido a aspectos proibitivos nas abordagens tradicionais. Para melhorar a eficiência do EnAVP foram avaliadas combinações de características físico-químicas e otimizados os hiperparâmetros. Ampliando o estudo dos AVPs está sendo desenvolvido um pipeline com AlphaFold2 para modelagem da estrutura dos AVPs, entre outros na avaliação das estruturas 3D, visando contribuir com a área da toxinologia, no desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas para o combate a doenças virais.

Métodos

Para otimizar os hiperparâmetros utilizados no EnAVP, avaliou-se a sua utilização tanto individualmente como a combinação de diferentes características como PCP, PseudoAAC, CTD, etc. O EnAVP foi comparado com preditores quanto às métricas de precisão e eficiência. O AlphaFold2 lançado em 2020, superou todos os métodos tradicionais na predição de estruturas na competição CASP14. É um modelo de Inteligência Artificial (IA) que utiliza características das estruturas do PDB, físico-químicas e conservação evolutiva de forma restritiva para estabelecer as coordenadas 3D de todos os átomos. O algoritmo IA realiza predições de forma eficiente mesmo para proteínas sem homólogos próximos evolutivamente, com moldes limitados a 10 resíduos. A qualidade e características (estereoquímicas, físico-químicas, interação, etc) das estruturas devem ser testadas e refinadas, buscando por melhores candidatos de forma automatizada e integrada por meio de uma pipeline.

Resultados e conclusões

A combinação das características *Pseudo amino acid composition* e *Physico-Chemical Properties* (PCP) apresentou os melhores resultados, e com a otimização dos hiperparâmetros o EnAVP obteve o melhor resultado contra 6 preditores da literatura, sendo o melhor modelo a distinguir um AVP de outro peptídeo qualquer.

Análises preliminares demonstraram que, apesar de a predição livre do AlphaFold2 não ser a melhor, apresenta resultados melhores do que preditores atuais, evidenciando sua importância na predição da estrutura de peptídeos, mesmo que pequenos.

Tanto a modelagem *in silico* quanto os métodos laboratoriais apresentam falhas e erros de precisão, e por isso muitas formas de avaliação dessas estruturas de proteínas são necessárias. Os métodos abordados para o pipeline proposto podem conduzir um estudo mais profundo acerca do comportamento e funcionalidade de peptídeos.

Suporte financeiro: CNPq.

Avanços na Predição de Peptídeos Bioativos Antivirais e Estruturas 3D por Redes Neurais

Laboratório de Toxinologia Aplicada - LETA
Orientador - Milton Yutaka Nishiyama-Jr

Aluna de IC
Letícia Carvalho Eustáquio Costa

Colaboradores
Caio Fontes de Castro
Fernanda Midori

Introdução

O interesse por Peptídeos Bioativos tem crescido devido à sua presença nos seres vivos e seu potencial para produção de novos fármacos com menor probabilidade de desenvolvimento de resistência, especialmente aqueles com ação antiviral, que podem ser alternativas aos antivirais tradicionais, que muitas vezes apresentam efeitos adversos aos pacientes. Este projeto é uma continuidade do desenvolvimento do preditor de Peptídeos Bioativos Antivirais (EnAVP) aplicado às proteínas de organismos venenosos em especial os Aracnídeos, visando diminuir o tempo e custo de prospecção desses compostos, devido a aspectos proibitivos nas abordagens tradicionais. Para melhorar a eficiência do EnAVP foram avaliadas combinações de características físico-químicas e otimizados os hiperparâmetros. Ampliando o estudo dos AVPs está sendo desenvolvido um pipeline com AlphaFold2 para modelagem da estrutura dos AVPs, entre outros na avaliação das estruturas 3D, visando contribuir com a área da toxinologia, no desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas para o combate a doenças virais.

Métodos

Para otimizar os hiperparâmetros utilizados no EnAVP, avaliou-se a sua utilização tanto individualmente como a combinação de diferentes características como PCP, PseudoAAC, CTD, etc. O EnAVP foi comparado com preditores quanto às métricas de precisão e eficiência. O AlphaFold2 lançado em 2020, superou todos os métodos tradicionais na predição de estruturas na competição CASP14. É um modelo de Inteligência Artificial (IA) que utiliza características das estruturas do PDB, físico-químicas e conservação evolutiva de forma restritiva para estabelecer as coordenadas 3D de todos os átomos. O algoritmo IA realiza predições de forma eficiente mesmo para proteínas sem homólogos próximos evolutivamente, com moldes limitados a 10 resíduos. A qualidade e características (estereoquímicas, físico-químicas, interação, etc) das estruturas devem ser testadas e refinadas, buscando por melhores candidatos de forma automatizada e integrada por meio de uma pipeline.

Resultados e conclusões

A combinação das características *Pseudo amino acid composition* e *Physico-Chemical Properties* (PCP) apresentou os melhores resultados, e com a otimização dos hiperparâmetros o EnAVP obteve o melhor resultado contra 6 preditores da literatura, sendo o melhor modelo a distinguir um AVP de outro peptídeo qualquer.

Análises preliminares demonstraram que, apesar de a predição livre do AlphaFold2 não ser a melhor, apresenta resultados melhores do que preditores atuais, evidenciando sua importância na predição da estrutura de peptídeos, mesmo que pequenos.

Tanto a modelagem *in silico* quanto os métodos laboratoriais apresentam falhas e erros de precisão, e por isso muitas formas de avaliação dessas estruturas de proteínas são necessárias. Os métodos abordados para o pipeline proposto podem conduzir um estudo mais profundo acerca do comportamento e funcionalidade de peptídeos.

Suporte financeiro: CNPq.

Padronização da Neuropatia Induzida pelo Quimioterápico Paclitaxel

Cruz L, Ferreira JC, Hosch N, Behr BM, Alcantara QA, Ferreira JCB, Zambelli VO. Laboratório Especial de Dor e Sinalização (LEDS), Instituto Butantan, Brasil.

Introdução: O paclitaxel é um quimioterápico que, apesar de eficaz em combater células cancerígenas, induz neuropatia em cerca de 70% dos indivíduos que a utilizam. Até o momento, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na neuropatia induzida por este medicamento. As mitocôndrias são organelas cruciais para suprir a demanda energética celular e sofrem continuamente os processos de fusão e fissão. Estes processos opostos trabalham em conjunto para manter a forma, tamanho e número de mitocôndrias. GTPases como a Mfn2, importante na fusão mitocondrial e Drp1, importante na fissão mitocondrial, regulam a plasticidade mitocondrial. Considerando que células nervosas apresentam elevada demanda metabólica e grande quantidade de mitocôndrias, e que a neuropatia induzida por quimioterápicos é frequentemente acompanhada de disfunção mitocondrial, nossa hipótese é que um desbalanço nos níveis de Mfn2 e Drp1 contribuem para o desenvolvimento da neuropatia. Assim, o objetivo deste projeto é investigar o papel da dinâmica mitocondrial na degeneração axonal do nervo isquiático de animais submetidos à neuropatia induzida pelo paclitaxel. Nesta primeira etapa, apresentaremos os resultados da padronização da neuropatia. **Métodos:** O paclitaxel (4 mg/Kg) ou veículo foi administrado nos dias 1, 3, 5 e 7 pela via intraperitoneal em camundongos C57/BL machos (18-20g). O limiar nociceptivo mecânico foi avaliado por filamentos de Von Frey e o limiar nociceptivo térmico ao frio pelo teste da acetona, antes e após o tratamento com Paclitaxel ou veículo. **Resultados:** A administração do paclitaxel reduziu o limiar nociceptivo mecânico e térmico (hipernocicepção) dos animais quando avaliados no 7º (80% e 158%, respectivamente), 14º (72% e 186%, respectivamente) dias após o tratamento, retornando aos níveis basais 28 dias após. **Conclusões:** A administração de paclitaxel induz hipernocicepção mecânica e térmica por pelo menos 14 dias, caracterizando uma hipernocicepção crônica. Estabelecemos satisfatoriamente um modelo de neuropatia induzida por quimioterápicos. Nas próximas etapas daremos prosseguimentos aos ensaios bioquímicos para a avaliação do papel da dinâmica mitocondrial neste efeito.

Suporte Financeiro: 103273/2022-0 (CNPq/PIBIC), CNPq 429221/2018-5

Variação sexual e quantidade de veneno produzida em *Bothrops atrox*

Guilherme C. Lima, Giovanni P. M. Silveira, Daniel R. Stuginski, Kathleen F. Grego, Sávio S. Sant'Anna

Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

Introdução: O ofidismo, ou seja os acidentes com serpentes peçonhentas, é atualmente considerada uma Doença Tropical Negligenciada, segundo a Organização Mundial da Saúde, afetando a vida de milhares de pessoas todos os anos. Dentre essas pessoas, as que habitam em zonas rurais, principalmente na região da Floresta Amazônica são as mais prejudicadas por esses acidentes. O gênero responsável pelo maior número de acidentes no Brasil é o gênero *Bothrops*, que compreende as serpentes popularmente conhecidas como “jararacas”, cuja espécie que lidera os índices de ofidismo na região Amazônica é *Bothrops atrox*. Sendo assim, o estudo em questão analisa características morfológicas da serpente *B. atrox*, como comprimento, massa, tamanho da cabeça, etc relacionando-as com o rendimento de veneno do respectivo animal. Com isso, pode-se inferir se tais relações são verdadeiras e existentes, não apenas para esta espécie em particular, mas também para outros Viperidae, como já observado, por exemplo, em *B. alternatus* e *C. durissus terrificus*. Além de verificar quais fatores são preditores do rendimento de veneno, a pesquisa também analisa se a produtividade desse veneno é influenciada pela diferença sexual, visto que há dimorfismo dentro da espécie. Havendo estas relações, outros estudos podem ser desenvolvidos com o objetivo de aumentar o rendimento de veneno para produção, bem como um melhor e mais eficiente tratamento dos pacientes afetados pelo ofidismo, levando à diminuição das consequências dos acidentes ofídicos existentes. **Métodos:** O objeto de estudo utilizado nesta análise é a serpente *Bothrops atrox* (Viperidae). Foram utilizados 46 espécimes para análises que relacionam massa e comprimento rostro-cloacal (CRC) e também ao tamanho da cauda dos animais. No entanto, para as análises relacionadas a rendimento de veneno, foram utilizados 38 espécimes, pois foram excluídos da amostra os indivíduos que perderam veneno durante a extração. Os animais foram extraídos três vezes, havendo um intervalo de 2 meses entre cada extração. Neste momento os animais também foram medidos e pesados. **Resultados e conclusões:** Foi verificado que os rendimentos de veneno entre as presas direita e esquerda dos animais foi semelhante. Nos machos, a produção mínima de veneno dentre todas as extrações foi de 113,2 mg, o máximo foi de 770,6 mg e a média foi de 372 mg. Nas fêmeas, o mínimo foi de 272,7 mg, a máxima foi de 1239,4 mg e a média foi de 629 mg. Após a análise de regressão do rendimento médio de veneno sobre o CRC, foi constatado que machos e fêmeas possuem uma reta de inclinação e elevação estatisticamente semelhantes ($p=0,1746$ e $p=0,07122$, respectivamente), podendo ser construída uma única reta de equação log da Quantidade de Veneno= $2,266 \cdot \log \text{CRC} - 4,078$ ($R^2=0,34$). Devido às fêmeas atingirem um CRC maior que o dos machos, a reta acompanha este crescimento,

mostrando que elas são capazes de produzir mais veneno por atingirem tamanhos maiores.

Suporte financeiro: PIBIC-CNPq

PROJETO CONHECENDO OS MOSQUITOS: AÇÕES DE POPULARIZAÇÃO DA CIÊNCIA COM FOCO EM CULICIDOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA

GIOVANNA DA FONSECA BATISTA

FLÁVIA VIRGINIO FONSECA

LABORATÓRIO DE COLEÇÕES ESPECIAL ZOOLOGICAS

Introdução: Apesar de apenas algumas espécies de mosquitos atuarem como vetores de patógenos prejudiciais aos humanos, são eles, os animais mais perigosos do mundo, causando cerca de 400 mil mortes por ano. Mesmo com o alto número de casos de doenças e mortes associadas a mosquitos, parte da população humana desconhecem ou não seguem as recomendações de prevenção individual e coletiva, assim não contribuem com o controle vetorial. Mídias sociais, como o Instagram, têm mudado o modo com que as pessoas vêem e interagem com os acontecimentos cotidianos, as quais vêm sendo importantes facilitadoras da aproximação de cientistas e não-cientistas. Portanto, o projeto visa testar a hipótese de que a popularização do conhecimento científico acerca dos mosquitos via Instagram pode incentivar a contribuição popular na aplicação de medidas individuais e coletivas de prevenção de doenças vetorizadas por estes insetos. Métodos: Para isso, foram utilizadas abordagens virtuais por meio da conta no Instagram: @conhecendoosmosquitos, bem como a aplicação de um questionário pós-teste online para a investigação do conhecimento e avaliação do impacto da intervenção. Resultados: Foram considerados os dados de 64 pessoas, sendo que a maioria dos respondentes eram estudantes de graduação, com idade entre 25 a 39 anos, residentes na cidade de São Paulo. Quando questionados sobre quais mosquitos atuavam como transmissores de patógenos, a maioria apontou corretamente, dentre outros gêneros também transmissores presentes na questão, o *Aedes*. De forma semelhante, quando questionados sobre doenças causadas por patógenos transmitidos por mosquitos, dengue e Zika receberam a maioria das respostas. Isso reflete a ampla disseminação dos termos “*Aedes*”, “dengue” e “Zika” nas grandes mídias. Além disso, para os entrevistados, as mídias sociais como Instagram, bem como o projeto, atuaram de forma efetiva na aproximação ciência e sociedade. Ademais, o material postado ao longo da pesquisa foi considerado extremamente importante para a percepção da importância dos mosquitos na vida dos entrevistados. Conclusões: Considerando os resultados obtidos até o momento, pode-se constatar que o projeto contribuiu para a democratização de acesso ao conhecimento dos mosquitos para os indivíduos. Espera-se que os resultados deste estudo colaborem para o entendimento do comportamento do público que acessa conteúdos de divulgação científica, bem como os que acessam sobre os mosquitos. E mais além, espera-se que o projeto gere de alguma forma mudanças de pensamentos enraizados acerca dos mosquitos e hábitos de controle vetorial.

Agência Financiadora: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

Estudo da composição química e funcional do veneno de serpentes senis da espécie *Bothrops atrox*

Aluna: Pamela Miranda Amaral

Orientadora: Anita Mitico Tanaka Azevedo

Colaboradores: Nathália de Costa Galizio, Caroline Serino Silva, Karen de Moraes Zani, Kathleen Fernandes Grego, Lidia Jorge Tasima, Leticia Sartori Valota

Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

Resumo:

A composição do veneno de serpentes apresenta uma grande complexidade e sua alta variabilidade é responsável pelos diversos casos médicos de envenenamento, que englobam desde danos teciduais até danos neurológicos. No Brasil, uma espécie responsável por muitos acidentes ofídicos é a *Bothrops atrox*, que habita o continente sulamericano em sua área subtropical e tropical. Seu envenenamento ofídico causa efeitos locais como hemorragia e necrose, além de efeitos sistemáticos como alterações na coagulação sanguínea. A serpente *Bothrops atrox*, ou jararaca do norte, é de extrema importância para o ecossistema na qual faz parte e o estudo do seu veneno auxilia no próprio tratamento por meio de soros antiveneno, como o soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan. Para obter uma maior eficiência no tratamento, é necessário estudar os fatores que geram variações na composição e atividades fisiopatológicas do veneno, sendo um deles a idade. Serpentes são consideradas senis quando alcançam entre oito a dez anos de idade e tem seu sistema imunológico mais lento, com menor atividade proteica. Esse projeto de pesquisa visa analisar a variação ontogenética do veneno das serpentes dessa espécie por meio do estudo de amostras de trinta e um indivíduos da espécie *Bothrops atrox*.

Métodos:

Para dar continuidade ao estudo proposto, os métodos incluem:

1. Dosagem por Bradford (1976): as proteínas presentes nos venenos das serpentes foram quantificadas para serem utilizadas com maior precisão nos próximos experimentos.
2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE): as amostras dos venenos foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% para analisar, por meio do tamanho das proteínas em kDa, a composição dos venenos, observando suas diferenças e semelhanças.
3. Western Blotting: método utilizado para verificar a resposta imunológica entre as proteínas do veneno e o soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan.

4. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA): será responsável por analisar a capacidade do veneno da *B. atrox* em ser reconhecida pelo soro comercial
5. Atividade fosfolipásica (PLA2): avaliação e quantificação da proteína Fosfolipase A2 no veneno das amostras.
6. Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC): cromatografia e separação dos componentes químicos do veneno.

Resultado:

Analisando o perfil eletroforético das amostras é possível perceber uma diminuição da expressão de certas bandas em indivíduos idosos. Além disso, os experimentos realizados foram capazes de mostrar certas diferenças entre fêmeas e machos que envolvem tamanho final e crescimento durante a senilidade.

Conclusão:

A diminuição da expressão de certas bandas pode ser diretamente relacionada à diminuição da letalidade da peçonha das serpentes senis, já que o sistema imunológico dos indivíduos fica mais lento. As fêmeas mostraram ter um crescimento maior até mesmo durante os anos mais avançados, envolvendo comprimento e peso. Isso pode estar relacionado com a capacidade das fêmeas de conter filhotes.

Suporte financeiro: ESIB, Instituto Butantan, Fundação Butantan

Título do projeto: Acoplamento das unidades catalítica e regulatória do proteassomo após mutações sítio-específicas

Nome da aluna: Natália Mori Avellaneda Penatti

Colaboradores: -

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Demasi

Laboratório: Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan

Introdução: Em leveduras da espécie *S. cerevisiae*, o grupo de pesquisa da profa. Dra. Marilene Demasi descreveu uma modificação redox pós-traducional denominada S-glutacionilação em resíduos Cys da subunidade $\alpha 5$ da unidade catalítica 20S do proteassomo, em especial o $\alpha 5$ -C76 e o $\alpha 5$ -C221. As linhagens $\alpha 5$ -C76S e $\alpha 5$ -C221S apresentaram como alteração fenotípica uma maior frequência da conformação fechada da câmara catalítica da unidade 20S e um menor tempo de vida cronológico (CLS: chronological life span). Uma dupla mutação randômica na subunidade $\alpha 5$ ($\alpha 5$ -S35P/C221S) induziu a abertura da câmara catalítica do 20S e também aumentou o CLS da célula. Neste trabalho, nos propusemos a estudar se as discrepâncias do CLS entre as linhagens estudadas devem-se a diferenças de acoplamento entre a unidade catalítica 20S e a unidade regulatória 19S do proteassomo. Ademais, avaliamos a funcionalidade mitocondrial dessas linhagens, visto que o acoplamento entre as unidades do proteassomo depende, dentre outros fatores, do bom funcionamento dessa organela.

Métodos: As linhagens WT, C76S e S35P/C221S do *S. cerevisiae* foram cultivadas em meio rico YPG (Yeast extract 1%, Peptone 2%, Glycerol 4%) e lisadas com a enzima Zymolyase. O estudo do acoplamento das unidades 20S-19S foi feito em gel nativo a partir de extrato celular da levedura. Para determinar a funcionalidade mitocondrial, foi feita a avaliação da atividade da citrato sintase mediante a reação de ácido ditionitrobenzóico (DTNB) com CoA-SH.

Resultados: 1) Observou-se que a linhagem C76S apresentou uma quantidade muito menor de proteassomos 26S e 30S quando comparada às demais linhagens.

2) A atividade da citrato sintase da linhagem C76S apresentou-se bastante diminuída em comparação com as outras linhagens.

3) Os pellets mitocondriais da C76S apresentaram tamanho reduzido e cor pálida esbranquiçada, enquanto os pellets das outras linhagens eram de cor acastanhada.

Conclusões: A partir dos resultados obtidos, concluímos que o menor CLS da linhagem C76S está acompanhado de um menor acoplamento entre as unidades 20S e 19S do proteassomo, provavelmente causado por uma disfuncionalidade mitocondrial evidenciado pela baixa atividade da citrato sintase e pelos pellets mitocondriais esbranquiçados, fato que sugere alguma alteração na citocromo C.

Suporte financeiro: PIBIC-CnPQ

“Análise da influência de frações do veneno de *Bothrops jararaca* na formação de biofilme e interação de amostras de *Escherichia coli* com padrão de aderência agregativo com células epiteliais “*in vitro*”.”

Ana Vitória dos Santos Souza

Orientador: Dr. Marcelo Palma Sircili

Laboratório de Genética

Introdução: *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é responsável por causar diarreia aguda com presença de muco, podendo acometer crianças e adultos. Embora sua infecção em muitos casos seja assintomática, sua persistente colonização promove má absorção de nutrientes pelo intestino delgado, podendo prejudicar o desenvolvimento infantil. Tal persistência é consequência direta de sua capacidade em formar biofilme. Biofilmes são comumente a causa de infecções bacterianas crônicas e os tratamentos convencionais mediados por antibióticos, colaboram com o aumento da pressão seletiva, culminando no surgimento de clones resistentes. Tendo isto em vista, é de extrema importância a busca por novas abordagens terapêuticas. A formação de biofilme possui regulação multifatorial e dentre estes fatores podemos destacar *Quorum sensing* (QS), um mecanismo de sinalização química dependente de densidade celular, capaz de modular a expressão de genes alvo. Uma medida de tratamento alternativo contra biofilmes, seria a interrupção deste mecanismo por *Quorum quenching*. Pensando nisso, e no potencial biológico inexplorado de moléculas de baixo peso do veneno de *Bothrops jararaca*, este estudo visou avaliar o efeito de diferentes concentrações de uma fração contendo moléculas com peso molecular inferior ou igual a 3kDa de veneno na formação de biofilme pela amostra protótipo de *E.coli* enteroagregativa 042, sorotipo O44:H18 e sua interação com células HeLa. Metodologia: Com o intuito de avaliar a ação do veneno, foram realizados testes de formação de biofilme, em superfícies abióticas e bióticas (células pré-fixadas) para análise da biomassa total, através da técnica de coloração com cristal violeta e em microscopia confocal a laser, por fim, foi realizado a contagem de bactérias viáveis, por Unidades formadoras de colônias (UFC). Todos os testes foram realizados em triplicata. Resultados e conclusões: Foi observado que em menor concentração de veneno, ocorre uma redução na formação de biofilme e em maiores concentrações ocorre um leve aumento. Após a análise estatística, apenas o tratamento com 100ng (menor concentração) da fração do veneno apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Estes resultados foram corroborados por microscopia confocal, pela análise da biomassa de biofilme em superfície abiótica e pelos testes de UFC. Em superfície biótica houve menor formação de biofilme, entretanto o efeito da fração de veneno se mostrou o mesmo. Os resultados obtidos indicam que há compostos presentes nesta fração capazes de modular a formação de biofilme pela amostra 042 e tal efeito depende da concentração utilizada, podendo afetar positivamente ou negativamente a formação deste fenômeno.

Apoio financeiro: PIBIC/PIBIT Fundação Butantan

Resumo do Projeto PIBIC/PIBITI

Autores:

Lucas Adrião Giovannini

Sergio Mestieri Chammas

Rosely Cabette Alves

Daniel Rabelo

Durvanei Augusto Maria

Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Industrial

Efeitos da atividade antiproliferativa do Flavonoide Artepelin e da sua formulação lipossomal em células de melanoma

O melanoma é uma neoplasia da transformação dos melanócitos normais. É um câncer de pele com o pior prognóstico, devido sua ocorrência de metástase em 5 a 10% dos pacientes, sendo um tumor agressivo e letal. A utilização de novas terapias e o prognóstico precoce tem mostrado bons resultados em relação aos tratamentos convencionais. Assim o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do melanoma é relevante para esse tipo de tumor como: a imunoterapia, terapias combinadas e nanopartículas, principalmente para aqueles que não mais respondem aos tratamentos convencionais. Artepelin C (ARC), composto utilizado neste estudo é um derivado prenilado do ácido p-cumárico, um dos principais compostos fenólicos encontrados na própolis verde brasileira (BGP) tendo sua botânica da *Baccharis dracunculifolia*. Estudos sobre o ARC mostram que seus efeitos benéficos à saúde se correlacionam com os efeitos à saúde de BGP e *B. dracunculifolia*. Sua ampla gama de benefícios farmacológicos inclui efeitos antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatórios, antidiabéticos, neuroprotetores, gastroprotetores, imunomoduladores e anticâncer. O ARC neste projeto foi obtido através do método de extração de fluido supercrítico, proporcionando que o solvente da extração e rendimentos para o ARC fossem significativos. Neste projeto, o ARC foi incorporado em lipossomas catiônicos

de DODAC (cloreto de dioctadecildimetilamônio), dado utilizados como nanocarreadores, que maximizam a eficácia de fármacos antitumorais, atingindo as células tumorais com maior especificidade e com menores efeitos colaterais. A Dacarbazina, alquilante indicado no tratamento de melanoma metastático. A associação farmacológica do ARC e Dacarbazina, demonstrou efeitos citotóxicos sinérgicos potencializando a diminuição da densidade celular e da atividade metabólica mitocondrial, a partir da concentração de 10nM em células de melanoma humano SK-MEL-28, sendo intensificado nos períodos de tratamento até 72 horas. Alterações citológicas demonstraram efeitos de toxicidade, com perda dos prolongamentos celulares e das modificações nas formas das células que em condições normais de cultura são fusiformes, com grandes projeções da membrana celular, fortemente aderidas a matriz extracelular, e quando tratadas com os quimioterápicos em associação se tornaram arredondadas. A importância dessa associação farmacológica entre duas ou mais drogas em células de melanoma com o ARC poderá contribuir no futuro para elaborar novas estratégias adjuvantes para esse tipo de tumor, que apresenta baixa resposta a quimioterapia convencional.

Financiamento: CNPq-PIBIT, CNPQ processo número 305056/2019-0

LABORATÓRIO DE COLEÇÕES ZOOLOGICAS – INSTITUTO BUTANTAN, SÃO PAULO, BRASIL

VICTOR HUGO PIMENTA MACHADO

ANTONIO DOMINGOS BRESCOVIT

INVENTÁRIO DE ARANEOFAUNA E ESCOPIOFAUNA (ARACHINIDA) NO PORTO DA CIDADE DE SANTOS-SP

1. Introdução

O porto de Santos é uma grande porta de entrada devido ao seu movimento de cargas, veículos, navios e containers, vindos de vários países do mundo. Estes podem conter diversos animais, entre os quais, artrópodes, e em muitos casos, aracnídeos. O acesso destes animais ao porto pode ocasionar introdução ou infestação de animais exóticos. Sendo assim, conhecer e inventariar os aracnídeos do porto é importante para futuras medidas sanitárias. Este estudo tem como principal objetivo inventariar as espécies de aranhas escorpiões na área do porto de Santos, com coletas manuais nos períodos da tarde e da noite. Além disso, dar destaque as espécies perigosas ou peçonhentas da área.

2. Materiais e Métodos

2.1 Descrição da área de estudo

O estudo vem sendo feito em 4 áreas do porto de Santos, localizado no litoral de São Paulo, Brasil (23°58'00S 46°18'00"W). É administrado pela Santos Port Authority (SPA), vinculada ao Ministério da Infraestrutura. Sua área atualmente é de 7,8 milhões de metros quadrados. Sua área está dividida em duas cidades: Santos e Guarujá (CODESP, 2020).

Foram escolhidos 4 pontos na área de estudo (Mapa 1): 1) zona de containers, 2) zonas com resquícios de mata, 3) zona com grande movimentação

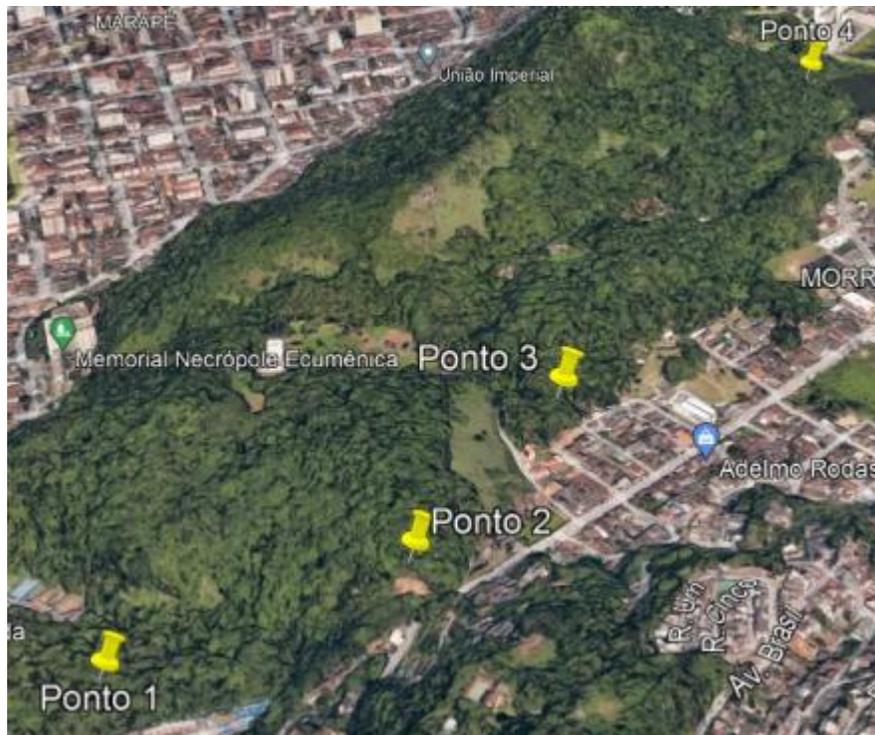
de pessoas, e 4) zona com baixa movimentação de pessoas.

As áreas de mata escolhidas foram as do morro Nova Cintra também em 4 pontos diferentes 1) próximo a depósitos de container vindo do porto, 2) sem movimentação de pessoas, 3) próximo de residências, 4) Mata com movimentação de pessoas.



1. Área do porto de Santos, São Paulo - locais de coleta

Fonte: Google earth



2. Mata do morro Nova Cintra, Santos, São Paulo, - locais de coleta

Fonte: Google earth

2.2 Coleta das aranhas e escorpiões

As aranhas e escorpiões foram coletados manualmente com ajuda de pinças e potes, dentro das áreas escolhidas nos períodos da tarde e noite. A noite o procedimento é o mesmo, mas com a ajuda de uma lanterna de cabeça. Os espécimes coletados estão sendo acondicionados em potes com álcool 80% e etiquetados por área. As coletas são realizadas em dois horários distintos: vespertino e noturno, com amostragens mensais, que serão feitas ao longo de dois anos, por um período de 1 hora por dia em cada área. Isso produzirá 50 coletas ao fim.

A cada trimestre os espécimes encontrados nesse período serão contabilizados, planilhados e identificados.

Ao final da amostragem, as áreas serão comparadas em relação a sua composição e diversidade.

2.3. Identificação dos indivíduos

Todos os indivíduos encontrados serão levados ao Laboratório de Coleções Zoológicas (LCZ) do Instituto Butantan, onde serão triados, identificados e planilhados. Posteriormente este material será tombado na coleção do LCZ.

3. Resultados preliminares

Nas áreas de mata até o momento foram identificadas 8 famílias de aranhas, além de opiliões, lacraias e escorpiões.

	Macho	Fêmea	Juvenil
Mimetidae	1	2	0
Araneidae	1	4	1
Nephilidae	3	4	3
Filistatidae	1	0	0
Anapidae	0	1	0
Ochyroceratidae	0	1	1
Coponiidae	1	2	0

Tabela com família de aranhas encontradas na mata

	Número de indivíduos
Opiliones	10
Scolopendridae	1
Scorpiones	0

Tabela com número de opiliões, lacraias e escorpiões, encontrados na mata

4. Conclusões

É necessário triar o resto do material para aperfeiçoamento da lista.

Suporte Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Referências

SPA, Santos Port Authority, Autoridade Portuária do Porto de Santos. Disponível em: <http://www.portodesantos.com.br/institucional/o-porto-de-santos/2020>.

Análise bioquímica dos peptídeos do veneno do sapo *Rhaebo guttatus*

Gabriela Magnólia Melo Viana, Lais Campelo Mendes, Daniel Carvalho Pimenta e Emidio Beraldo Neto

Laboratório de Bioquímica, Instituto Butantan

Venenos e secreções animais estão entre os fluidos biológicos mais concentrados e diversos do ponto de vista molecular que existem na natureza. Na maioria dos bufonídeos essa mistura complexa de compostos foi selecionada através de pressões, dependendo dos predadores e/ou microrganismos. O anfíbio *Rhaebo guttatus*, tem como mecanismo de defesa a secreção voluntária de seu veneno, esguichando jatos de veneno contra o agressor, contrariando a defesa típica dos anfíbios, esse veneno é constituído por dois principais grupos de componentes, aminas biogênicas e esteróides. A parte peptídica desse veneno nunca foi apropriadamente abordada, portanto nesse trabalho nos propomos a descrever esses peptídeos por técnicas cromatográficas e de espectrometria de massas.

Foram realizados dois diferentes preparo de amostra para descomplexação a partir do veneno bruto: (1) foi realizado uma extração com uma solução TFA e metanol (0,1:20), a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi utilizado; (2) uma partição líquido-líquido foi aplicada em solução diclorometano-agua (50:50), a qual a solução aquosa foi utilizada para análise posterior. A análise exploratória do perfil dessas extrações foi realizada em um equipamento C18-RP-UFLC acoplado a um espectrômetro de massas ESI-IT-TOF em modo LC-MS.

A primeira extração se mostrou eficiente identificando 20 peptídeos de massas 1542Da até 3398Da, eluídos dos minutos 9.5 a 17.5. A realização de partição líquido-líquido do veneno bruto resultou na separação de peptídeo de maior massa molecular 8564Da, eluído no minuto 16.4. Estas análises ainda devem ser otimizadas, os peptídeos sequenciados e suas funções analisadas.

Portanto, na proporção em que não há descrições de peptídeos em venenos de anfíbios pertencentes à família bufonidae, este achado se torna de grande relevância pois a caracterização de venenos permite a ampliação de estudos e descoberta de novas moléculas, bem como suas possíveis aplicações e efeito biológico.

O projeto é fomentado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC).

**POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO E ADJUVANTE DO
MONOFOSFOESTER 2-AEH2F E DO PACLITAXEL EM CÉLULAS DE
CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO – 4T1**

Alvaro Jorge Laiso Machado, Rosa Andrea Nogueira Laiso, Laertty Garcia Cabral, Daniel da Conceição Rabelo, Durvanei Augusto Maria.

O câncer de mama ocupa a segunda posição em número de casos e, segundo GloboCAN, a estimativa global é de 2.179.457, para o ano de 2040, cerca de 3.059.829 casos. Na população feminina, o câncer de mama também é comumente diagnosticados (24,2%), sendo o mais frequente em 154 países e a principal causa de morte por câncer (15,0%) em 103 países. Dados de prevalência, estimativa e mortalidade câncer, divulgados pelo GloboCan e pela agencia internacional de pesquisa em câncer. Uma abordagem promissora para o tratamento do câncer de mama seria aproveitar a susceptibilidade destas células para drogas que induzem a apoptose. É então necessário identificar compostos novos e mais específicos. Novos medicamentos destinados a induzir a morte celular podem representar opções terapêuticas mais eficazes para o tratamento tumoral. Atualmente, os análogos de alquilisofosfolípido (ALPs) representam uma nova classe de lipídios com atividade antitumoral. Têm sido relatado que ALPs são potentes indutores de apoptose em tumores malignos. Diferentemente da maioria dos agentes quimioterápicos, os ALPs não agem no DNA, mas que atuam ao nível da membrana celular, inibindo o “turnover” da membrana, interferindo na sinalização lipídica que, por sua vez, pode desencadear a morte celular por apoptose.

Neste projeto utilizamos o modelo in vitro com a célula tumoral murina 4T1 de mama triplo negativo, que possui baixa resposta terapêutica tem resposta a tratamento , pois é negativa para os receptores de estrógeno, progesterona e HER-2. Foram determinadas as concentrações inibitórias IC50% pelo ensaio colimétrico MTT (efeito de dose e reposta) nas células tumorais 4T1 e em fibroblastos normais. O composto teste avaliado foi o alquilfosfolipideo, 2-aminoetil di-hidrogenofostato (2-AEH2F) e com o tratamento quimioterápico Paclitaxel após 24,48 e 72 horas e suas associações. Foram também avaliados o potencial elétrico mitocondrial (sonda rodamina 123) e as fases do ciclo celular

(Iodeto de propideo), por citometria de fluxo. Os resultados mostraram efeitos citotóxicos do composto 2-AEH2F e sua potencialização sinérgica com o quimioterápico Paclitaxel, na concentração da IC50%, nos intervalos de tempo testados. Foi avaliado a produção de radicais lipoperoxidados a partir da reação da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), predominantemente o malondialdeído (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. O tratamento com o 2-AEH2F resultou em uma diferença significativa na formação de radicais peroxidados lipídicos da linhagem tumoral de mama 4T1, a partir da concentração de 30Mm, apresentando danos oxidativos significativos. Além desses achados, ocorreu diminuição do potencial mitocondrial. As fases do ciclo celular sofreram alterações com o tratamento com 2-AEH2, tendo uma diminuição da população celular na fase G2/M no tratamento com 40mM, acompanhando com o aumento da proporção de células com DNA fragmentado. Nossos resultados demonstraram significativo potencial inibidor da proliferação do composto 2-AEH2F, podendo ser um potente agente farmacológico sinérgico no controle da progressão tumoral.

Financiamento: PIBIC-CNPq e CNPq processo número 305056/2019-0

Variações ontogenéticas em PLA2 e SVMP em *Bothrops* sp e *C. d. terrificus*:

Um estudo em neonatos

Aluno: Rebeca Barcelos Jantsch

Colaboradores: Beatriz Kopel, Caroline Serino-Silva, Daniel Carvalho de Souza, Nathália Gazito, Victor Kavazoi.

Orientador: Anita Tanaka-Azevedo.

Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

1.Introdução

Esse estudo busca analisar a variabilidade inter e intraespecífica no perfil do veneno de neonatos de serpentes do gênero *Bothrops* e da subespécie *C. d. terrificus*, e seu efeito na neutralização do veneno dessas espécies pelo soro antibotrópico e anticrotálico comercial. Visto que a menor imunorreatividade do soro comercial antibotrópico em neonatos de serpentes como *B. jararaca* indicada por estudos e o levantamento do Hospital Vital Brasil (São Paulo) de que o envenenamento ofídico é causado majoritariamente por serpentes fêmeas e juvenis demonstram que a ontogenia não pode ser ignorada ao se analisar a questão do acidente ofídico no Brasil.

2. Métodos e Resultados

A partir da análise dos resultados, observou-se que os perfis obtidos por SDS-PAGE dos pools de neonatos das espécies *B. jararaca*, *B. moojeni*, *B. leucurus* e *B. alternatus* foram similares aos encontrados em referências sobre os perfis de espécimes adultos. Tendo sido notada uma predominância de bandas de proteínas nas regiões entre 10 e 15 kDa e entre 20 e 100 kDa. Todavia, algumas variações intraespecíficas e interespecíficas foram observadas, especialmente para as espécies *B. leucurus* e *B. alternatus*, respectivamente.

Além dos perfis eletroforéticos, os resultados obtidos pelo Western Blotting para as espécies do gênero *Bothrops* também foram consoantes às variações vistas pelo SDS-PAGE, com algumas poucas divergências em relação ao reconhecimento de algumas bandas de proteínas, sobretudo para a espécie *B. leucurus*. Sendo assim, o soro comercial antibotrópico se mostrou eficiente em reconhecer as proteínas encontradas nos venenos dos neonatos.

Em relação à subespécie *C. d. terrificus*, os resultados obtidos pelo Western Blotting mostraram que o soro comercial anticrotálico também é eficaz em reconhecer as proteínas presentes nas amostras dos indivíduos dessa subespécie, apesar das variações individuais previamente encontradas. Ademais, percebeu-se também uma variação ontogenética

expressiva na região dos 75 kDa, onde no pool de indivíduos adultos há a presença de uma banda de proteínas que não é encontrada nos neonatos. Não obstante, o antiveneno se mostrou capaz de reconhecer essa faixa de proteínas mesmo em espécimes de neonatos.

3. Conclusões

As divergências encontradas apontam que devem ser levadas em considerações as variações sexuais e ontogenéticas para a produção de antivenenos mais abrangentes. No entanto, para uma melhor análise e compreensão das diferenças encontradas, ainda serão realizados testes de ELISA, além do teste de Dose Mínima Coagulante a fim de se quantificar a menor dose de veneno que coagula uma solução padronizada de plasma ou fibrinogênio em 60 segundos. Com isso, será possível um melhor apontamento das variações inter e intraespecíficas nos venenos de neonatos das amostras analisadas.

Placentação e desenvolvimento embrionário em *Psychosaura macrorhyncha* (Hoge, 1946)

Aluno: Bruno Cardoso Silva

Orientadora: Prof^a Dr^a Selma Maria de Almeida Santos

Co-orientadores: Dr. Luis Miguel Lobo e Dr^a Serena Najara Migliore

Laboratório de Ecologia e Evolução - Instituto Butantan

1 RESUMO

A *Psychosaura macrorhyncha* é uma espécie bromelícola endêmica que habita a costa e as ilhas continentais do Brasil (HEDGES & CONN, 2012; COSTA & BÉRNILS, 2018). Ela faz parte de um grupo de espécies onde a maior parte dos nutrientes necessários para o desenvolvimento embrionário são fornecidos pela mãe por uma placenta complexa, já que os oócitos são pequenos e pobres em vitelo (VITT & BLACKBURN, 1991; BLACKBURN & VITT, 1992; BLACKBURN, 2006; BLACKBURN & FLEMMING, 2009; RAMÍREZ-PINILLA, 2014), diferentemente da maioria dos lagartos, que são ovíparos (BLACKBURN & VITT, 1992).

A placenta dos Mabuyinae possui área especializada na troca de nutrientes entre o embrião e mãe denominada placentoma (VITT & BLACKBURN, 1991) e aréolas coriônicas, formadas por epitélio absorptivo (BLACKBURN & FLEMMING, 2009), interligados por segmentos respiratórios. A placentação em répteis escamados é um processo raro, mas a complexidade desse processo vista nas espécies Mabuyinae é singular (RAMÍREZ-PINILLA, 2014), apesar de não se conhecer muito a respeito desse processo nas espécies brasileiras.

2 MÉTODOS

As amostras foram coletadas principalmente em áreas de Mata Atlântica no nordeste e sudeste brasileiros (MIGLIORE, 2021) advindas de coleções zoológicas. A análise macroscópica será realizada mensurando o comprimento rostro-cloacal dos embriões com uso de paquímetro digital seguindo sua curvatura da coluna do embrião (MIGLIORE, 2021) e lupa, posteriormente sendo fotografados em estereomicroscópio acoplado à câmera digital. Para a análise microscópica, serão feitos cortes transversais e longitudinais do placentoma, das aréolas coriônicas e dos segmentos respiratórios. Os fragmentos de tecido são submetidos à desidratação seriada em etanol e xilol para emblocamento em parafina, secção em cortes de 5 µm corados por hematoxilina & eosina para análise em microscópio. Os dados coletados serão relacionados estatisticamente pelos dados coletados por Migliore (2021) a nível de confiança de 5%.

3 RESULTADOS E CONCLUSÕES

Das coleções zoológicas que foram contatadas, não houve resposta da maioria ou a quantidade de exemplares da espécie depositados na coleção é pequena, dificultando a coleta de amostras. A coleção do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas permitiu a abertura de 1 animal não sexado, assim como a coleção do Museu de Zoologia da Universidade Federal de Viçosa permitiu a coleta de 2 embriões em estágio avançado de desenvolvimento. Sendo assim, o laboratório dispõe de aproximadamente 30 embriões.

O protocolo de desidratação das estruturas embrionárias precisa ser reajustado para cada etapa do desenvolvimento, visto que a constituição e o volume dos tecidos se alteram, reagindo, assim, de formas diferentes a um mesmo protocolo. O trato reprodutivo das fêmeas de *P. macrorhyncha* apresenta características histológicas similares a outros répteis escamados.

4 SUPORTE FINANCEIRO

O aluno recebe o suporte financeiro mensal de R\$ 400 pela Fundação Butantan.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLACKBURN, D. G. Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. **Herpetological Monographs**, v. 20, p. 131-146, 2006.
2. BLACKBURN, D. G.; FLEMMING, A. F. Morphology, Development, and Evolution of Fetal Membranes and Placentation in Squamate Reptiles. **Journal of Experimental Zoology: Molecular And Developmental Evolution**, v. 312B, p. 579-589, 2009.
3. BLACKBURN, D. G.; VITT, L. J. Reproduction in Viviparous South American Lizards of the Genus *Mabuya*. HAMLETT, W. C. **Reproductive Biology of South American Vertebrates**. Nova York: Springer-Verlag, p. 150-164, 1992.
4. COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 11-57, 2018
5. HEDGES, S. B.; CONN, C. E. A new skink fauna from Caribbean islands (*Squamata, Mabuyidae, Mabuyinae*). **Zootaxa** 3288, p. 1-224. 2012.
6. MIGLIORE, S. N. **Estratégias reprodutivas de lagartos Mabuyinae do Brasil**. [Reproductive strategies of mabuyinae lizards from Brazil] 2021. 118f. Tese (doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.
7. RAMÍREZ-PINILLA, M. P. Biología reproductiva y placentotrofia en lagartijas del género *Mabuya*, **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 38, p. 106-117, 2014.
8. VANZOLINI, P. E.; REBOUÇAS-SPIEKER, R. Distribution and differentiation of animals along the coast and on continental islands of the State of São Paulo, Brasil: Reproductive differences between and within *Mabuya caissara* and *M. macrorhyncha* (Sauria, Scincidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 29, n. 15, p. 95-109, 1976.
9. VITT, L. J.; BLACKBURN, D. G. Ecology and Life of the Viviparous Lizard *Mabuya bistriata* (Scincidae) in the Brazilian Amazon, **Copeia**, v. 1991, n. 4. p. 916-927, 1991.

Estudo dos eventos de splicing alternativo e seu papel como mecanismo complementar em carrapatos

Nelson Alves Yamashita

Dr. Milton Yutaka Nishiyama-Jr

Laboratório de Toxinologia Aplicada - LETA

nelsonayamashita@usp.br

Introdução

Eventos de *Splicing Alternativo* (AS) são um importante mecanismo regulatório em eucariotos, porém há pouco conhecimento do impacto em Carrapatos, um importante vetor para diversos patógenos. O estudo de AS e seu papel associado ao sistema imune na resposta ao estresse a patógenos pode trazer novas descobertas. O estudo permitirá avaliar abordagens para tratar dados de sequenciamento por RNA-Seq para AS em organismos não modelo. Os resultados foram integrados ao banco de dados de grafos desenvolvido, com a finalidade de associar aos dados das redes metabólicas e de sinalização dos carrapatos.

Métodos

O estudo foi baseado em dados de RNA-seq de *Ixodes scapularis* do NCBI, com quatro réplicas biológicas de amostras controle e infectadas pela doença de *Lyme*.

No pré-processamento para controle de qualidade foram utilizadas as ferramentas Trimmomatic, Fastx e Bowtie2. Para alinhamento do RNA-seq no genoma utilizamos o HISAT2, e SAMtols para pós-processamento. Para a predição dos eventos de *splicing* são comparados dois programas, rMATS e SplAdder e na análise de expressão gênica diferencial (DEG) utilizamos o DESeq2.

Para construção do bancos de dados de grafos utilizamos o Neo4J, pelo qual construímos uma séries de scripts para coletar informações da API do KEGG para reconstrução das vias metabólicas como grafos, além de integrar os dados de expressão e AS obtidos pelos experimentos.

Resultados

O rMATS foi a abordagem que apresentou os melhores resultados, tendo sido identificados 2927 eventos de AS, em sua maioria eventos de *exon skipping* e *mutually exclusive exons*. Pela análise dos DEGs por evento de splicing, os eventos de *exon skipping* apresentaram mais funções atribuídas, e foram os variantes com maior diferença na expressão, sendo sua maioria reprimida.

Na construção do banco de dados, conseguimos integrar 127 vias metabólicas, com 593 enzimas, 1091 compostos e 1110 genes com 7552 relações entre eles. Dentre esses genes conseguimos adicionar as informações de expressão a 831 deles, associados a 187 isoformas de AS.

A partir da estrutura de grafos, uma busca pelos substrato, enzima e produto de uma reação que em um banco de dados relacionado necessitaria de pelo menos 3 operações do tipo *join*, conseguimos reduzir a uma simples e rápida operação de busca.

Conclusões

No estudo sobre as funções alteradas diferenciando os grupos mais e menos expressos, verificamos que há muita diferença funcional entre os eventos AS, o que pode indicar que eventos associados a funções específicas. Há um maior número de genes reprimidos, o que pode indicar uma possível inibição do sistema imune do carrapato para existência da relação vetor-patógeno.

A criação do banco de grafos permite replicar a estrutura biológica de vias metabólicas, o que facilita na elaboração de consultas e na análise de seus resultados, além do ganho na velocidade e recursos computacionais usados nessa busca.

Suporte Financeiro

CNPq

Determinar o potencial do polissacarídeo O13 de *Escherichia coli* como antígeno vacinal contra *S. flexneri* 2a.

Kaique Ferrari Miranda, Luis Fernando dos Santos, Marcia Regina Franzolin, Suzana de Souza Barreto, Ronaldo Maciel Marques, Renata Hirome Nakagima Gonçalves, Marta de Oliveira Domingos

Laboratório de Bacteriologia Instituto Butantan

Shigella spp e *Escherichia coli* as principais espécies bacterianas responsáveis por diarreia. No entanto, devido à alta diversidade encontrada entre seus mecanismos de virulência, epidemias e distribuição geográfica não existe uma vacina universal contra esses patógenos. Foi observado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, que a proteção contra alguns sorogrupos de *E. coli* diarreiogênicas, pode ser mediada por anticorpos contra seus antígenos O específicos. Sendo que, o antígeno O13 de *E. coli* presente na molécula de LPS é igual ao antígeno 2a presente na molécula de LPS de *S. flexneri*, o objetivo desse estudo foi determinar se anticorpos contra o antígeno O13 eram capazes de reconhecer diferentes categorias de *E. coli* O13 e *S. flexneri* 2a. Para isso, utilizamos uma amostra de *S. flexneri* 2a e duas amostras diferentes de *E. coli* O13 obtidas do Instituto Adolfo Lutz. O Teste bioquímico EPM Mili foi utilizado para comprovar a identificação das amostras bacterianas, o teste de Maneval foi utilizado para determinar a presença de capsula nas amostras e o perfil antimicrobiano das mesmas foi determinado pela técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer frente aos seguintes antibióticos: cefoxitina, ciprofloxacino, gentamicina, tetraciclina e cotrimoxazol. As técnicas de hemaglutinação em lâmina e Dot Blot foram utilizadas para verificar a capacidade dos anticorpos contra o antígeno O13 de reconhecer as amostras de *E. coli* O13 e *S. flexneri* 2a. Os resultados obtidos com o teste EPM Mili ratificaram a identidade das amostras bacterianas. No entanto, mostraram que uma das amostras de *E. coli* O13 possuía motilidade e era capaz de descarboxilar a lisina enquanto a outra não, indicando que essas amostras pertencem a duas categorias diferentes de *E. coli* diarreiogênicas. O resultado obtido com o método de Maneval mostrou que todas as amostras possuem capsula. Os resultados obtidos com o teste de disco-difusão mostrou que a amostra de *S. flexneri* 2a é resistente a tetraciclina e ao cotrimoxazol. A amostra de *E. coli* O13 móvel capaz de descarboxilar a lisina foi sensível a todos os antibióticos testados enquanto a outra foi resistente a tetraciclina. O resultado obtido com o teste de hemaglutinação em lâmina mostrou que os anticorpos contra o polissacarídeo O13 foram capazes de reconhecer *S. flexneri* 2a melhor do que a amostra de *E. coli* O13 com motilidade capaz de descarboxilar a lisina. O resultados do teste de Dot Blot mostraram que esses anticorpos reconheceram melhor as amostras bacterianas cujas capsulas foram retiradas por aquecimento do que as bactérias capsuladas. Em resumo, os resultados obtidos mostraram que os anticorpos contra o polissacarídeo O13 são capazes de reconhecer diferentes categorias de *E. coli* O13 e *S.*

flexneri 2a. Todavia, a presença de capsula diminuí a intensidade de reconhecimentos desses anticorpos.

Reatividade vascular, receptor de angiotensina e sinalização intracelular em *Oxyrhopus guibei* (Colubridae) e *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae).

Nicole Macedo de Oliveira, Maria Cristina Breno

Laboratório de Farmacologia/Instituto Butantan

O sistema circulatório das serpentes, cuja longa coluna sanguínea é paralela ao solo, é submetido a uma mesma intensidade gravitacional ao longo de todo o seu comprimento. Esses animais adaptaram-se, também, a diferentes *habitat* como o terrestre e o aquático, em que são expostos a grandes variações da força gravitacional, exigindo um pronto e eficiente ajuste de fluxo sanguíneo corpóreo preservando a irrigação para tecidos vitais como cérebro e coração. Esses ajustes são possíveis por adaptações anatômicas, comportamentais e por interferência dos sistemas neurais e humorais endógenos, como o sistema peptídico renina-angiotensina (SRA). A análise desse último sistema, na filogenia dos vertebrados, mostra a sua importância para a fisiologia cardiovascular de diferentes espécies animais, contribuindo de maneira relevante para a sobrevivência dessas espécies em diferentes habitats. Quanto aos peptídeos ativos do SRA, como a angiotensina II (AngII), eles podem ser gerados de forma sistêmica (via clássica), como também localmente em tecidos, exercendo ações parácrinas e autócrinas importantes. Estudos anteriores do nosso laboratório com as serpentes *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca*, família Viperidae, e *Oxyrhopus guibei*, família Colubridae, caracterizaram receptor funcional para AngII cujo perfil farmacológico empregando antagonistas seletivos, difere dos receptores clássicos AT₁ e AT₂. Algumas espécies de roedor, ave, anfíbio e peixe apresentam também perfil farmacológico do receptor de AngII similar ao caracterizado nessas serpentes. Para as três espécies de serpentes, já foi verificado que a via intracelular da fosfolipaseC/inositol fosfato não é ativada, mas há a participação de alguma isoforma de proteína quinase C na vasoconstrição produzida por AngII. Ademais, alguns mecanismos como o aporte de cálcio do meio extra/intracelular, por via canal de cálcio operado por estoque e/ou estoque de cálcio sensível à rianodina do retículo sarcoplasmático são similares, por vezes, aos encontrados para o AT₁ clássico de mamíferos. Fatores liberados pelo endotélio vascular não estão envolvidos na constrição produzida por AngII nessas serpentes. Assim, esse projeto propõe dar continuidade ao estudo do receptor para AngII e da dinâmica intracelular associada a ele, e a atividade biológica de metabólitos ativos da AngII, empregando ensaios funcionais (*in vitro*) com a aorta isolada da *O.guibei* e da *C.d.terrificus*. Os estudos sobre o SRA serão ampliados e aprofundados em relação a mobilização/mecanismo de cálcio celular associado ao receptor de AngII, metabólitos da AngII, vias de quinase e de

AMPcíclico. Dessa forma, traçaremos o perfil de funcionamento da AngII e de seus metabólitos, compreendendo esse sistema em suas ações na regulação cardiovascular dos vertebrados, em particular, dos répteis. Suporte financeiro: CNPq.

“Clonagem, expressão e caracterização de uma proteína de *Leptospira interrogans* contendo domínios repetidos de leucina”

João P. G. Inácio¹, Aline F. Teixeira¹, Leandro T. Kochi¹, Luís G. V. Fernandes¹, Maria B. Takahashi¹ e Ana L. T. O. Nascimento¹

¹Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas

Introdução: Leptospiras patogênicas são os agentes causadores da leptospirose, uma doença de importância agropecuária e de saúde pública. As leptospiras penetram facilmente as barreiras físicas do hospedeiro, colonizando seus túbulos renais, de modo que passam a ser secretadas na urina, contaminando o ambiente. O homem é um hospedeiro acidental da doença e, estima-se que 1 milhão de pessoas são acometidas pela doença anualmente, culminando cerca de 60 mil mortes. Vacinas contra leptospirose humana são aprovadas em poucos países e tem sua eficácia associada apenas aos sorovares utilizados na preparação vacinal. Proteínas da membrana externa das leptospiras são alvos interessantes de estudo, pois podem interagir com componentes do hospedeiro e, devido a sua localização, são alvos do sistema imunológico. Proteínas LRR (*Leucine Rich Repeat*) são caracterizadas pela presença de múltiplas regiões contendo diversos resíduos de leucina e apresentam diversas funções relacionadas às interações patógeno-hospedeiro. Assim, o presente estudo tem como objetivo clonar, expressar e purificar uma sequência que corresponde a uma proteína LRR de *L. interrogans* sorovar Copenhageni e avaliar suas propriedades imunogênicas.

Métodos: O gene *lic11098* foi estudado *in silico*, amplificado por PCR, clonado no vetor pAE e expresso em diferentes linhagens de *Escherichia coli*. A purificação da proteína recombinante foi feita por cromatografia de afinidade e sua estrutura foi avaliada por dicroísmo circular. A proteína recombinante produzida foi detectada por SDS-PAGE e Western blotting

Resultados: A predição dos softwares LipoP, Cello, DeepTMHMM e Psortb, indicam a proteína alvo como sendo extracelular. Já os programas PFAM e SMART realizaram a predição dos domínios da proteína, de modo que ela apresenta apenas domínios LRR. A modelagem do programa PSIPRED mostrou que a proteína é rica em α -hélices e folhas- β , o que corresponde com a literatura científica. Em seguida, foi avaliada a conservação da proteína entre o gênero *Leptospira*. Observou-se que ela se apresenta conservada entre espécies patogênicas de *Leptospira*, principalmente entre estirpes de *L.*

interrogans, o que pode elegê-la como um potencial candidato vacinal. Após a clonagem, a proteína foi expressa em diferentes estirpes de *E. coli* em 10 mL de cultura, sendo a estirpe BL21 Star (DE3) pLysS selecionada para expressar a proteína em 400mL com 1mM IPTG, por 16 horas à 18 °C. A proteína foi purificada em uma concentração final de 0,94 mg/mL. Os resultados do dicroísmo circular foram analisados pelo software BeStSel, mostrando que a proteína é composta 31,3% de α -hélices, 54,5% de folhas- β e apenas 14,2% de estrutura irregular, denotando que a proteína possui estrutura secundária.

Conclusão: A proteína LRR de *L. interrogans* foi clonada, expressada e purificada sem mutações e com peso molecular esperado. O dicroísmo circular indicou que a proteína possui estrutura secundária, importante para a caracterização funcional.

Suporte financeiro: CNPq, FAPESP e Fundação Butantan.