



I SIMPÓSIO
ARAUCÁRIA
EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

27 a 29 junho de 2017

LIVRO DE RESUMOS

ABSTRACT BOOK



<http://www.prppg.ufpr.br/simposioaraucaria/>



COMISSÃO ORGANIZADORA

Dr. Alejandro Correa (Coordenador PPG em Bociências e Biotecnologia, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)

Dra. Andrea Senff Ribeiro (PPG em Biologia Celular e Molecular, UFPR)

Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (PPG em Biologia Celular e Molecular, UFPR)

Dr. Francisco Filipak Neto (PPG em Biologia Celular e Molecular, UFPR)

Dra. Lysangela Alves (PPG em Bociências e Biotecnologia, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)

Samuel Goldenberg (PPG em Bociências e Biotecnologia, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)

Raquel Keller (PPG em Bociências e Biotecnologia, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)

Anny Walosky Robert Kulig (PPG em Bociências e Biotecnologia, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)

Bruna Aparecida Comotti de Oliveira (PPG em Biologia Celular e Molecular, UFPR)

Bruno Accioly Alves Romagnoli (PPG em Bociências e Biotecnologia, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)

Mariana Sayuri Ishikawa Fragoso (PPG em Bociências e Biotecnologia, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)

Marina Augusto Heuschkel (PPG em Bociências e Biotecnologia, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)

Vanessa Rossini Severo (PPG em Bociências e Biotecnologia, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)

APOIO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas



UFPR
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA
Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná



PARANÁ

Seti



CAPES



IBMP
INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ

KASVI
<http://kasvi.com.br/>



COMITÊ CIENTÍFICO

ICC

Dra. Ana Paula Abud
Dra. Cintia Horinouchi
Dr. Diogo Kuczera
Dra. Fabiola Holetz
Dr. Guilherme Ferreira Silveira
Dr. Helisson Faoro
Dr. Leonardo Foti
Dr. Letusa Albrecht
Dr. Michel Batista
Dra. Priscila Mazzocchi Hiraiwa
Msc. Rodrigo Netto Costa
Dra. Sandra Crestani
Dra. Sheila Nardelli

UFPR

Dra. Carolina Camargo de Oliveira
Dra. Celia Regina Cavichiolo Franco
Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Dr. Katya Naliwaiko
Dr. Marco Antonio Ferreira Randi
Dr. Silvio Marques Zanata
Dr. Olga Meiri Chaim
Dra. Luiza Helena Gremski
Dr. Fernando Louzada
Dra Lia Sumie Nakao
Dra. Fernanda Simas
Dra. Sheila M. B. Winnishofer
Dra. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos
Dr. Rubens Bertazzoli Filho
Dr. Silvio Sanches Veiga

ASSESSORIA DE COMUNICAÇÃO

Renata Fontoura (Assessoria de Comunicação, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)
Wagner Nagib (web design e arte visual, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)
Itamar Crispim (Fotografia, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR)
Lucas Rocha (Tecnologia de Informação, Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, UFPR)



SUMÁRIO

1. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS17576 (Q279R) DO GENE MMP9 EM EURO-BRASILEIRAS COM DIABETES GESTACIONAL	1
2. ANÁLISE COMPARATIVA DO METABOLISMO DE CÉLULAS NÃO-TUMORAIS E TUMORAIS APÓS AÇÃO DE SUBSTÂNCIA COM ATIVIDADE ANTITUMORAL.....	3
3. PREDICTION OF NONCODING RNAs AND THEIR TARGETS IN <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SMR1	5
4. ESTUDOS DOS EFEITOS DA DESCELULARIZAÇÃO E DO USO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA BIOCOMPATIBILIDADE DE BIOPRÓTESES VALVARES	7
5. IMUNOGENICIDADE DE VARIANTES DE AMA1 DE <i>Plasmodium vivax</i>	9
6. EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT HUMAN WNT SIGNALING MODULATORS FOR FUNCTIONAL ANALYSIS.....	11
7. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS731236 DO GENE <i>VDR</i> EM EURO-BRASILEIROS COM <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 1.....	12
8. CARACTERIZAÇÃO E TESTE DE NOVOS SISTEMAS DE TRANSPOSIÇÃO PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULAS CHO-S.....	13
9. POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DA COX-2 COMO MECANISMO CITOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATO DE <i>ASPIDOSPERMA SUBINCANUM</i>	14
10. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA DNA POLIMERASE TERMOESTÁVEL DERIVADA DE <i>Thermococcus kodakaraensis</i> (KOD).....	15
11. CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA CARDÍACO E SEU PAPEL NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS.....	16
12. CÂNCER DE MAMA: TCTP COMO ALVO TERAPÊUTICO	17
13. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS) PROVENIENTES DE FONTES RENOVÁVEIS.....	19
14. ANTI-EGF ANTIBODY SEQUENCING FOR IN-VITRO MATURATION	21
15. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA VIA DE SÍNTESE DE UDP-XILOSE EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	23
16. EXPRESSÃO DE RNAs NÃO CODIFICANTES LONGOS (LNCRNAs) NO INÍCIO DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO	24
17. EXOME SEQUENCING ANALYSIS IDENTIFIES POSSIBLE CAUSAL MUTATIONS IN A BRAZILIAN FAMILY WITH STARGARDT DISEASE.....	26
18. EFEITO DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE O PERFIL LIPÍDICO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO VISCERAL DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À PROGRAMAÇÃO METABÓLICA POR REDUÇÃO DE NINHADA.....	28
19. CARACTERIZAÇÃO DE GRÂNULOS DE RNPM DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO E ANÁLISE DO SEU PAPEL DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	30
20. POLIMORFISMO NO GENE <i>PAX4</i> (RS712701) EM CRIANÇAS COM <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 1.....	32



21. O PAPEL DAS PROTEÍNAS DEDO DE ZINCO TCZC3H39 E ZFP29 NO METABOLISMO DE RNA DO <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
22. CHARACTERIZATION OF <i>Trypanosoma cruzi</i> TRANSLATION INITIATION FACTORS IF4E AND SPECIFIC INTERACTIONS WITH THE TCIF4G5 ISOFORM.....	34
23. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS SEIS HOMÓLOGOS DO FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO EIF4E DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
24. ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE ABCA7 COM A IDADE DE INÍCIO E AVALIAÇÃO COGNITIVA EM PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER.	37
25. PLATAFORMA BASEADA EM HPLC PARA DETERMINAÇÃO DE TOXINAS URÊMICAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	39
26. IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NUCLEOTIDE SUGAR TRANSPORTERS IN <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
27. SINVASTATINA TEM AÇÃO CITOTÓXICA E SUPERA A RESISTÊNCIA MEDIADA PELO PROCESSO AUTOFÁGICO EM CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO	42
28. DELEÇÃO DA HISTONA DESACETILASE 2 (TGHDAC-2) AFETA A INVASÃO E A REPLICAÇÃO DE <i>Toxoplasma gondii</i>	44
29. PROSPECÇÃO PROTEÔMICA DE BIOMARCADORES ERITROCITÁRIOS ASSOCIADOS AO <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 2	45
30. IDENTIFICAÇÃO DE MIRNAS ASSOCIADOS A POLISSOMOS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS	46
31. EVIDÊNCIAS DE ATIVIDADE DO RETROTRANSPON Viper EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
32. POLISSACARÍDEOS DO <i>Capsicum anuum</i> (PIMENTÃO): ATIVIDADE ANTITUMORAL NO MODELO DE CARCINOMA SÓLIDO DE EHRLICH EM CAMUNDONGOS	49
33. ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE POLISSACARÍDEOS DO <i>Solanum bataceum</i> (TAMARILLO) EM MODELO DE CARCINOMA.....	50
34. DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES PARA DETECÇÃO E INIBIÇÃO DA OSTEOPONTINA	51
35. ANÁLISE DE LINCRNAS IDENTIFICADOS EM REGIÕES ULTRACONSERVADAS TRANSCRITAS NO CÂNCER DE MAMA	52
36. STRESS INDUCIBLE PROTEIN 1 (STI1) IS SECRETED INTO THE ECM BY THE ER-GOLGI PATHWAY IN ASTROCYTES <i>IN VITRO</i>	53
37. CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E CONTROLE POR WESTERN BLOTTING.....	54
38. EFEITOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DE MEDULA ÓSSEA HUMANA NO TRATAMENTO DE ASMA EM CAMUNDONGOS BALB/C	56
39. INFLUENCE OF INTERLEUKIN-10 rs1800872 (C.-592C>A) POLYMORPHISM ON HPV INFECTION AND OVER IL-10 CERVICAL LEVELS IN HPV INFECTED WOMEN	58
40. POLYMORPHISMS IN THE TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 GENE INFLUENCE CERVICAL LESIONS DEVELOPMENT	60
41. DESCOBERTA, ANÁLISES COMPUTACIONAIS E EXPRESSÃO DE SBRNAS EM <i>Drosophila melanogaster</i> 61	



42. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO LNCRNA NORAD EM TUMORES DE MAMA E SUA CORRELAÇÃO COM A INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA.....	63
43. FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF <i>Trypanosoma brucei</i> RRP44 RIBONUCLEASE	64
44. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO E RECICLAGEM DE ADAM23 ATRAVÉS DO MÉTODO DE BIOTINILAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE CELULAR.	66
45. AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DO SNP rs16942 DO GENE BRCA_1.....	68
46. OS EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO E DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE PUMILIO DURANTE A CARDIOMIOGÊNESE DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS.....	69
47. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS POR CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS: PAPEL EM TERAPIAS DO SISTEMA CARDIOVASCULAR.	71
48. PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE <i>Plasmodium falciparum</i> E <i>Plasmodium vivax</i> USANDO REAGENTES NACIONAIS.....	73
49. A EXONUCLEASE XRNA E O METABOLISMO DE MRNA EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	75
50. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO PEPTÍDEOS LIGANTES À SUPERFÍCIE DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
51. EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA PROTEÍNA KIN DE <i>Homo sapiens</i>	78
52. VESÍCULAS EXTRACELULARES DE <i>Trypanosoma rangeli</i> MODULAM A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS E DE CITOCINAS EM CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO HUMANAS <i>IN VITRO</i>	80
53. CARACTERIZAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA MIGRAÇÃO INDUZIDA PELA ATIVIDADE DE QSOX1 EXTRACELULAR EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA (VSMC).	82
54. O PAPEL DA AUTOFAGIA NO CRESCIMENTO <i>in vivo</i> E NA RESPOSTA À TERAPIA EM GLIOMAS.....	84
55. PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE EXOSSOMOS PARA ESTUDOS EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA.....	86
56. INTERACTOME ANALYSIS OF FGFR2 – A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET IN BREAST CANCER. ...	88
57. DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE QPCR PARA DETECÇÃO DE <i>Chlamydia trachomatis</i> EM AMOSTRAS OCULARES.....	89
58. IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ALPHA- AND BETA-AMASTINS FROM <i>Trypanosoma cruzi</i>	91
59. GENERATION OF RECOMBINANT PEPTIDES AGAINST TRYPOMASTIGOTE SURFACE PROTEINS OF <i>Trypanosoma cruzi</i> : NEW TOOLS TO IMPROVE DRUG DESIGN.....	92
60. PHOSPHOLIPASE D FROM VENOMS OF <i>LOXOSCELES</i> SPIDERS: A STRUCTURAL, BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL COMPARISON	93
61. CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE POLPA DENTÁRIA.....	95
62. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>TPM1, 2, 3 E 4</i> EM CARCINOMAS MAMÁRIOS E TECIDO NÃO TUMORAL.....	97
64. LARGE-SCALE PHENOTYPING TO IDENTIFY GENES OF <i>Trypanosoma cruzi</i> RELATED TO DRUG RESISTANCE.....	99
65. SÍNTESE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA APLICAÇÃO EM CULTURA TRIDIMENSIONAL DE ORGANISMOS UNICELULARES E PLURICELULARES	100



66. THUYA OCCIDENTALIS 30CH REDUZ CARACTERÍSTICAS TUMORIGÊNICAS E METASTÁTICAS EM MODELO DE MELANOMA MURINO <i>IN VITRO</i>	102
67. TGHDAC4: UMA HISTONA DESACETILASE ÚNICA DE APICOMPLEXA	104
68. TCTP COMO ALVO TERAPÊUTICO NO TRATAMENTO DO MELANOMA.....	105
69. AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DO TECIDO DE PERICÁRDIO BOVINO SUBMETIDO AO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO PARA USO EM BIOPRÓTESES VALVARES	107
70. EFEITO DO POLIMORFISMO RS2279796 (G>A) DO GENE <i>ABCA7</i> NOS NÍVEIS DE LIPÍDEOS SÉRICOS DE MULHERES OBESAS	109
71. ANALYSIS OF CIRCULATING MIRNAS IN SERUM AND CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE, LEWY BODIES DEMENTIA AND PARKINSON'S DISEASE WITH DEMENTIA.	111
72. HIGHER FREQUENCY OF THE <i>APOE 4</i> ALLELE AND LOWER BUTYRYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN WOMEN WITH MILD COGNITIVE IMPAIRMENT: POSSIBLE PROGNOSIS MARKERS FOR DEVELOPING ALZHEIMER'S DISEASE.....	113
73. COMPARAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGENICA <i>IN VITRO</i> ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMIAIS DO TECIDO ADIPOSEO E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMIAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATAS SOB INFLUÊNCIA DA TRIIODOTIRONINA	114
74. TRIIODOTIRONINA NÃO INFLUENCIA NA DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGENICA <i>IN VITRO</i> DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMIAIS DO TECIDO ADIPOSEO DE RATAS.....	116
75. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MIR-9 EM SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER ...	118
76. INVESTIGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS DE TRANSPOSIÇÃO NO GENOMA DE <i>Schistosoma japonicum</i>	120
77. EXPRESSION OF BCL-6 AND ITS ROLE IN NOTCH SIGNALING	122
78. INVESTIGAÇÃO DE COMPONENTES ESPECÍFICOS E ESSENCIAIS PARA EXPORTAÇÃO DE MRNA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	123
79. IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ELEMENTOS DA VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG EM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO: UMA VISÃO PÓS-TRANSCRICIONAL.....	125
80. DESENVOLVIMENTO DE QPCR DUPLEX PARA DETECÇÃO DE <i>Leishmania</i> spp. USANDO REAGENTES NACIONAIS	126
81. CARACTERIZAÇÃO DO RNA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA SEPSE	128
82. INTERAÇÕES PROTEICAS DA QSOX RECOMBINANTE EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA.....	129
83. EFFECTS OF HEAT STRESS ON THE RENAL AND BRANCHIAL CARBOHYDRATE METABOLISM AND ANTIOXIDANT SYSTEM OF ANTARCTIC FISH	130
84. EFFECT OF LONG-TERM THERMAL STRESS ON ANTARCTIC NOTOTHEIID <i>Notothenia rossii</i> JUVENILES	132
85. ESTUDOS DE LOCALIZAÇÃO DE MIOSINAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i>	133
86. CARACTERIZAÇÃO DO METILPROTEOMA DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> ...	135
87. A BUSCA POR NOVOS CANDIDATOS VACINAIS CONTRA A MALÁRIA VIVAX ATRAVÉS DA VACINOLOGIA REVERSA.....	137
88. POLIMORFISMOS DO GENE <i>FCN1</i> NA FEBRE REUMÁTICA E CARDIOPATIA REUMÁTICA CRÔNICA	138
89. CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF <i>Macrocybe titans</i> POLYSACCHARIDE	139



90.	UREMIC TOXINS INHIBIT AUTOPHAGIC FLUX BLOCKAGE AT THE END-STAGE OF AUTOPHAGY.....	141
91.	POLIMORFISMO RS9404941 DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>APOM</i> EM CRIANÇAS COM DM1143	
92.	MITOCHONDRIAL LOCALIZATION OF THIOREDOXIN1.....	145
93.	PAPEL DOS RESÍDUOS DE CISTEÍNA NA PROTEÍNA <i>APOPTOSIS-INDUCING FACTOR</i>	146
94.	MÉTODO MOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À SEPSE.....	148
95.	MANEJO FARMACOTERAPÊUTICO EM PACIENTES COM CARCINOMA PULMONAR.....	150
96.	PROTEOMA DO TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E COMPARAÇÃO COM O TUMOR PRIMÁRIO CORRESPONDENTE.....	152
97.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DE INTERAÇÕES PROTEICAS EM TECIDOS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS DE PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA.....	153
98.	OCORRÊNCIA DE SÍFILIS NO LABORATÓRIO MUNICIPAL DE LAGES SC.....	155
99.	ACONSELHAMENTO GENÉTICO E INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE FAMÍLIAS COM HISTÓRICO DE CÂNCER NA COMUNIDADE MENONITA DE WITMARSUM (PR).....	156
100.	NA VANGUARDA DA ONDA DA NANOTECNOLOGIA: CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO E SEUS EFEITOS SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFERO.....	157
101.	POLYMORPHISMS OF THE COMPLEMENT SYSTEM MODULATE SUSCEPTIBILITY TO PEMPHIGUS FOLIACEUS.....	159
102.	IDENTIFICAÇÃO DE UMA POSSÍVEL HISTONA-LINKER EM <i>Toxoplasma gondii</i>	160
103.	COMPLEXO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO (M1) ACELERA CICATRIZAÇÃO DA PELE EM CAMUNDONGOS MODULANDO ENZIMAS DE REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR.....	162
104.	ANALYSIS OF AUTOPHAGY AND APOPTOSIS IN BRAIN CORTEX OF HIGHLY AGGRESSIVE SWISS WEBSTER MICE BY APPLYING THE MODEL OF SPONTANEOUS AGGRESSION (MSA).....	164
105.	MONTAGEM, ANOTAÇÃO E COMPARAÇÃO DE GENOMAS DE BACTÉRIAS OPORTUNISTAS DO GÊNERO HERBASPIRILLUM ISOLADOS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA.....	166
106.	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS COMO FERRAMENTAS PARA O ESTUDO DOS RETROTRANSPOSONS VIPER E TATE EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	168
107.	TATE: UM RETROTRANSPOSON SOBREVIVENTE NOS GENOMAS DE TRIPANOSOMATÍDEOS.....	170
108.	IDENTIFICAÇÃO DE FOSFOPROTEÍNAS REGULADORAS DO PROCESSO DE METACICLOGÊNESE EM <i>Trypanosoma cruzi</i>	172
109.	POLYMORPHISM IN INSULIN GENE (rs689) IN ADULTS EURO-BRAZILIAN WITH TYPE 1 DIABETES	173



1. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS17576 (Q279R) DO GENE MMP9 EM EURO-BRASILEIRAS COM DIABETES GESTACIONAL

Adriana Teleginski, Claudia Dib da Costa, Marciane Welter, Luiza Cristina Gobor, Dayane Alberton, Fabiane Gomes de Moraes Rego, Glaucio Valdameri, Geraldo Picheth.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

E-mail: adrianteleginski@gmail.com

Introdução: Diabetes *mellitus* gestacional (DMG) é definido como qualquer grau de intolerância à glicose, diagnosticado durante a gestação. O DMG aumenta o risco de complicações para a gestante e para o feto. No presente, em todo o mundo 1-14% das gestações são complicadas pelo DMG. No Brasil, o DMG atinge cerca de 7% das gestantes. Entre fatores de risco para este distúrbio, estão a obesidade, a idade materna avançada e a história familiar de diabetes. A relevância dos fatores genéticos, fazem dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) alvos de interesse, associado ao DMG. Uma grande família de endoproteínases conhecidas como metaloproteínases de matriz (MMPs; *Matrix Metalloproteinases*), enzimas implicadas em múltiplos processos fisiológicos e patológicos, atuam na degradação e remodelação da matriz extracelular (MEC). No DMG, foi demonstrado o aumento na expressão do gene da MMP9 e de seu produto no soro, no útero e nos tecidos da placenta. A expressão de MMP9 é importante para a função das células do sistema imune, no entanto o DMG é caracterizado por baixo grau de inflamação, com consequente produção anormal de citocinas e mediadores. Estudos têm demonstrado que a expressão de MMP9 é elevada durante patologias envolvendo processos inflamatórios tais como DMG. O gene MMP9 (cromossomo 20; 20q13.12) é segregado pelos macrófagos e sua expressão é regulada a nível de transcrição. O polimorfismo de único nucleotídeo A>G (rs17576) no éxon 6 do gene MMP9, promove a substituição de uma glutamina por arginina na posição 279 (Gln279Arg ou Q279R). Esta variação afeta o domínio de ligação ao substrato da enzima MMP9, substituindo um aminoácido não carregado (glutamina) por outro carregado positivamente (arginina). Este polimorfismo altera a conformação da proteína, levando a uma alteração na ligação do substrato e na atividade enzimática. O objetivo deste estudo foi determinar a associação do polimorfismo rs17576 em um estudo caso-controle com gestantes Euro-Brasileiras saudáveis e com DMG. **Material e métodos:** Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE 09664412.4.0000.0101. A amostra foi composta por 262 gestantes, sendo 131 saudáveis (controle) e 131 gestantes com DMG, classificadas segundo os critérios da Sociedade Brasileira de Diabetes (2009). A genotipagem foi realizada com sondas fluorescentes (*TaqMan*®; code: C_11655953_10; *Applied Biosystems*), em PCR em tempo real (7500 *Fast*). **Resultados:** O polimorfismo analisado está em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. As comparações genotípicas ($P=0,032$) e alélicas ($P=0,011$) foram



significativamente diferentes entre os grupos. As frequências genotípicas (%) para os grupos controle e DMG, respectivamente, foram A/A: (54,2) e (38,2%) / AG: (37,4) e (48,8) / GG: (8,4) e (13). A frequência do alelo menor (MAF, % e 95%IC) foi 27,1 (22-32) em gestantes saudáveis, e 37,4 (32-43) na presença do DMG. A frequência do alelo raro do rs17576 no grupo controle foi semelhante ao descrito para a população Hispânica (27,3%) (*HapMap*). Indianos e japoneses mostraram frequências maiores (53-64%). Não foram encontrados outros estudos na população brasileira. **Conclusão:** O polimorfismo rs17576 no gene MMP9 foi associado ao DMG na população Euro-brasileira estudada. O alelo G foi associado ao maior risco de desenvolvimento do DMG (*Odds ratio* 1,61; 95%IC:1,11-2,33).

Fonte financiadora: Fundação Araucária; CNPq.



2. ANÁLISE COMPARATIVA DO METABOLISMO DE CÉLULAS NÃO-TUMORAIS E TUMORAIS APÓS AÇÃO DE SUBSTÂNCIA COM ATIVIDADE ANTITUMORAL

Alan de Almeida Veiga¹, Marco Augusto Stimamiglio², Alessandra Melo Aguiar², Bruno Dallagiovanna Muñiz², Ana Paula Ressetti Abud².

¹ Acadêmico de Biomedicina, Faculdades Pequeno Príncipe

² Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, Instituto Carlos Chagas - Fiocruz Paraná

E-mail: alanwessels@hotmail.com; ana_abud@hotmail.com

Introdução: O ácido dicloroacético (DCA), utilizado há anos no tratamento de distúrbios metabólicos apresentou uma propriedade antitumoral ao reverter o perfil glicolítico aeróbico (Efeito Warburg) das células cancerígenas. A droga age inibindo a enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK), a qual inibe o complexo piruvato desidrogenase, que catalisa a conversão do ácido pirúvico em acetil-CoA, iniciando o Ciclo do Ácido Cítrico. Estudos acerca dos efeitos desta droga sobre as células não-tumorais fazem-se necessários para averiguar a segurança da mesma. Este trabalho tem por objetivo verificar as influências no metabolismo celular desempenhado pelo DCA em duas linhagens celulares, uma tumoral (*HeLa*) e uma não tumoral (fibroblastos humanos dérmicos normais/NHDF). **Metodologia:** ensaios de citotoxicidade pelo método de captura do vermelho neutro; análise da atividade mitocondrial via sondas fluorescentes MitoTracker Red CMXRos e Rhodamine 123 (Life Technologies®); mensuração da produção de espécies reativas de oxigênio via sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma Aldrich®); verificação das taxas de apoptose e necrose via sondas fluorescentes Annexin V-PE e 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (BD-Pharmingen®); mensuração do consumo de glicose e produção de lactato via equipamento YSI 2700 Select VARV 184 (Thermo Fischer Scientific®). A análise estatística deu-se pelo teste t de Student não-pareado, de ao menos três experimentos independentes, e com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. **Resultados e discussão:** a sensibilidade das células *HeLa* ao DCA mostrou-se muito maior em relação às células NHDF, após a comparação dos valores de IC50 e DL50 obtidos pelos ensaios de citotoxicidade, e estes forneceram as concentrações da droga utilizadas nos demais ensaios posteriores. A redução do potencial de membrana mitocondrial esperada pela ação do DCA nas células tumorais não foi observada, porém, a droga não exerceu alterações significativas sobre as células NHDF. Em estudos prévios, foi relatado que o DCA aumentou a produção das espécies reativas de oxigênio de maneira dose-dependente em células tumorais, mas tal efeito não foi observado de maneira estatisticamente significativa nas células *HeLa*. As taxas das espécies reativas nas células NHDF não sofreram aumento após a ação do DCA, o que atesta a favor da segurança da droga. Os ensaios das taxas de apoptose e necrose encontram-se pendentes de análise. **Conclusão:** os resultados no modelo tumoral adotado neste estudo não se encontram em consonância total com a literatura. Porém, a observação de que o DCA não causou às células não-tumorais efeitos na atividade



mitocondrial, bem como não influenciou no aumento das taxas de espécies reativas de oxigênio, confere um resultado positivo. Uma vez que o DCA é uma droga de administração oral, sua distribuição pela corrente sanguínea não exclui sua interação com as demais células não-tumorais. Portanto, a visualização da segurança no espectro de ação seletivo sobre as células tumorais, e sem alterações significativas no metabolismo das células não-tumorais, traz à tona uma substância muito promissora como tratamento complementar aos agentes antitumorais já estabelecidos.



3. PREDICTION OF NONCODING RNAs AND THEIR TARGETS IN *Herbaspirillum seropedicae* SMR1

AC Garcia, LF Moreno, HS Cirino, MZ Tadra-Sfeir FO Pedrosa, EM Souza, RA Monteiro, MB Steffens

Biochemistry and Molecular Biology Department, Federal University of Paraná, PR, Brazil.

Herbaspirillum seropedicae is an endophytic bacterium, belonging to the group of beta-proteobacteria, with the ability to fix nitrogen that contributes to the growth of economically important grasses. The genome of *H. seropedicae* SmR1 strain was completely sequenced and annotated by the GENOPAR Program. It was observed that this bacterium has 4,735 ORFs (open reading frames) in a single chromosome, occupying about 88.3% of the genome. This annotation did not consider the presence of regulatory-encoding RNA genes, known as small RNAs (sRNAs) or noncoding RNAs (ncRNAs). These molecules modulate physiological responses through different mechanisms, through RNA-RNA interaction or RNA-protein interaction. The interaction of these molecules with their target occurs by perfect pairing of short sequences (*cis*-encoded ncRNAs) or by partially pairing of short sequences (*trans*-encoded ncRNAs). Some interactions in the *trans*-acting class may be stabilized by the chaperone Hfq. Besides that, exists the Riboswitches, located on the 5' end of the mRNA and less frequently in 3' end, which can respond to environmental signals, high temperatures or small molecules ligands. Recently, in prokaryotes, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Regions (CRISPR) have been described and consists of in tandem repeats of base sequences (spacer DNA) resulting from previous exhibitions to exogenous plasmid or bacteriophage. In the prediction of ncRNAs in *H. seropedicae* SmR1, we used the computational tools nocoRNAC, GSalgorithm, Cufflinks, Rockhopper, TransTermHP and Infernal.1.1.1. CRISPRFinder and CRISPRmap were used to predict the CRISPR of regions, TargetRNA2 tool was used to predict mRNA targets and Blastn was used for DNA sequence alignments. As results 228 ncRNAs, named nchSmR1, were predicted in the *H. seropedicae* SmR1 genome. These genes were expressed in different experimental conditions of RNAseq and 55 of them were identified according to the Rfam 12.0 database, such as the *cis*-encoded 5'_ureB_sRNA, rimP, PyrR, CsrC, Betaproteobacteria_toxic_sRNA, TPP riboswitch, FMN, cobalamin, ykkC-yxkD, sucA; the *trans*-encoded sX4, sX11, sX6, MicC, IsrK, IsrD, IsrG. A CRISPR RNA region was predicted in *H. seropedicae* SmR1 genome. The 6SRNA a *housekeeping* ncRNA which regulates de DNA Polymerase activity was also predicted and detected in the RNAseq. The number of targets for each nchSmR1 was variable. For example, nchSmR1_45 with 11 targets, nchSmR1_149 with 45 targets and nchSmR1_104 with 99 targets, nchSmR1_01 with 16 targets, nchSmR1_140 with 5 targets. Moreover, for some non-coding RNAs, such as nchSmR1_42, there was no prediction of targets. The mRNA targets predicted in *H. seropedicae* SmR1 are related to different biochemical mechanisms, for example, among the 4.5S RNA targets are:



argB (acetylglutamate kinase), Hsero_3355 (lipoprotein), glk (glucokinase), htpX (Heat shock protein HtpX), Hsero_2759 (transcriptional regulatory protein). These results will contribute to the understanding of the participation of this type of RNA in the regulation of the metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1.

Supported by: CAPES, CNPq and INCT



4. ESTUDOS DOS EFEITOS DA DESCELULARIZAÇÃO E DO USO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA BIOCAMPATIBILIDADE DE BIOPRÓTESES VALVARES

Amanda Leitolis¹, Paula Hansen Suss², João Gabriel Roderjan², Andressa Vas Schittini², Mariana Amorós³, Francisco Diniz Affonso da Costa², Marco Augusto Stimamiglio⁴, Alejandro Correa Dominguez⁴

¹ Universidade Federal do Paraná

² Pontifícia Universidade Católica do Paraná

³ IBYME, Buenos Aires, Argentina

⁴ Instituto Carlos Chagas – Fiocruz PR

E-mail: aleitolis@gmail.com

Válvulas cardíacas são estruturas responsáveis por manter o fluxo sanguíneo unidirecional no interior do coração, alterações no seu funcionamento podem ocorrer devido a doenças ou infecções prévias, na maior parte dos casos o principal tratamento para tais distúrbios compreende a intervenção cirúrgica para substituição valvar. Nesse tipo de procedimento, diferentes modelos biológicos de próteses de válvula cardíaca podem ser utilizados, entretanto, tais modelos podem induzir respostas imunes decorrentes da composição celular do enxerto transplantado. Em virtude disso, a descclularização, procedimento para eliminação das células alogênicas do tecido, vem sendo testado como alternativa para melhorar a biocompatibilidade das biopróteses valvares. Desse modo, o objetivo inicial desse trabalho foi avaliar os efeitos da descclularização em válvulas cardíacas porcinas. Primeiramente, válvulas cardíacas pulmonares porcinas obtidas de abatedouro credenciado, foram caracterizadas quanto a sua composição celular por meio de imunofluorescência para observação dos marcadores eNOS, vWF, MYHII e vimentina. Em seguida, essas válvulas foram submetidas a um protocolo de descclularização com solução de SDS 0,1 %, para confirmar a remoção do conteúdo celular, os tecidos foram avaliados através da marcação com DAPI e H&E. Para verificar se a matriz-extracelular (MEC) manteve-se íntegra após a descclularização foram realizadas histologias com as colorações de Pentacrômico de Movat, Picrossírius Red, Tricrômico de Gomori e PAS-Alcian Blue, além de imunofluorescência para Elastina e Colágenos I e III. Nossos resultados mostraram que tecidos nativos porcinos apresentam marcações positivas para células endoteliais na camada externa da fibrosa e da ventricularis das cúspides e na camada íntima do conduto, presença de células musculares lisas nas camadas íntima, média e adventícia do conduto, e fibroblastos distribuídos ao longo de toda a válvula em especial nas cúspides. Após a descclularização, não foram verificadas marcações positivas para células na maioria dos tecidos estudados, além disso, a composição da MEC (GAG, colágenos e elastina) parece não ter sido afetada. Recentes descobertas indicam que vesículas extracelulares (VEs), tais como exossomos e microvesículas,



podem ter um importante papel no transplante de órgãos, podendo atuar de várias formas, inclusive na indução da tolerância ao tecido transplantado. Desse modo, um segundo objetivo deste trabalho é verificar a biocompatibilidade das válvulas descelularizadas com células cardíacas humanas e verificar o potencial de VEs em melhorar essa propriedade da. Para os estudos de biocompatibilidade entre a prótese porcina e as células humanas, tecidos cardíacos provenientes dos ventrículos, da válvula mitral e da aurícula de doadores humanos foram obtidos e utilizados para o isolamento de células e de VEs. As células cardíacas humanas isoladas compreendem uma população heterogênea formada em sua maioria por fibroblastos cardíacos, células musculares lisas e células progenitoras. Quanto às VEs, foram identificadas partículas de aproximadamente 150 nm. Interessantemente, ensaios *in vitro* mostram que as VEs derivadas do coração humano induzem a migração de células tipo endoteliais (HMEC-1). Em suma, nossos dados indicam que o protocolo de descelularização utilizado foi capaz de remover a maioria das células mantendo a integridade da MEC, entretanto, outros estudos deverão ser conduzidos para verificação da interação entre as células cardíacas humanas isoladas e a válvula porcina descelularizada.



5. IMUNOGENICIDADE DE VARIANTES DE AMA1 DE *Plasmodium vivax*

Ana Beatriz lung Enembreck da Silva¹, Ana Paula Schappo², Najara Bittencourt³, Stefanie Lopes⁴, Fabio Costa⁵ e Letusa Albrecht⁶.

¹ Acadêmica do curso de Biomedicina pela Universidade Tuiuti do Paraná e bolsista PIBIC no Instituto Carlos Chagas- FIOCRUZ-PR

² Mestre pelo Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia - ICC/FIOCRUZ-PR

³ Mestre pelo Programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular UNICAMP

⁴ Pesquisadora do Instituto Léonias e Maria Deane - LMD/FIOCRUZ-AMAZONAS

⁵ Professor da Universidade Estadual de Campinas

⁶ Pesquisadora do Instituto Carlos Chagas - ICC/FIOCRUZ -PR

E-mail: letusa.albrecht@fiocruz.br

Todo o ano o parasito da malária infecta milhões de pessoas, aumentando cada dia mais seu número de vítimas. No Brasil o principal causador da malária é o *Plasmodium vivax*, sendo responsável por cerca de 88% dos casos. A infecção causa um grande impacto na população de áreas endêmicas, e a formação de uma imunidade adquirida pode levar vários anos. O aparecimento de cepas que são resistentes as drogas utilizadas no tratamento da infecção por *P. vivax*, mostra a necessidade da investigação de outros métodos de tratamento e no desenvolvimento de uma vacina. Um dos principais candidatos vacinais contra malária *vivax* é o antígeno da membrana apical 1, conhecido como AMA1. AMA1 está relacionada com a invasão do parasito do filo Apicomplexa nos eritrócitos, participando na formação de uma junção de movimento, conseguindo a partir disto, invadir a célula do hospedeiro. É uma proteína que contém um ectodomínio rico em cisteína, um domínio transmembrana e uma região citoplasmática. Esses resíduos de cisteína se incorporam em oito pontes dissulfeto formando os três domínios da molécula, no qual o domínio II se apresenta altamente conservado, sendo a região mais imunogênica durante a infecção de *P. vivax*, e o domínio I apresenta a maior taxa de mutações e diversidade genética. Esta diversidade genética pode comprometer a eficácia de uma vacina que inclua AMA1 em sua formulação. Sendo assim, este trabalho visa caracterizar a imunogenicidade de variantes da proteína AMA1 de *P. vivax* de isolados brasileiros, avaliando a presença de anticorpos adquiridos naturalmente e avaliando a reatividade cruzada entre estas variantes. A partir de um estudo prévio realizado pelo grupo, foram identificadas duas variantes da proteína AMA1 frequente nos isolados brasileiros de *P. vivax*. As sequências das variantes de AMA1 de *P. vivax* foram amplificadas, clonados e por fim expressados em sistema procarioto. A partir das proteínas expressas e purificadas,



foram realizados testes de imunoenensaio (ELISA) com soro de pacientes infectados com *P. vivax* para a detecção de anticorpos IgG naturalmente adquirido contra este antígeno. Os resultados mostram que as variantes da proteína AMA1 de *P. vivax* aqui estudadas são imunogênicas, sendo constatado que há a presença de anticorpos IgG naturalmente adquiridos. Foi observado que, apesar das duas variantes serem imunogênicas, a variante 2 foi mais reconhecida pelos anticorpos IgG presentes no soro, mostrando que apesar da identidade de 86% entre as variantes, o reconhecimento foi diferente. A necessidade da evolução de pesquisas para o conhecimento mais aprofundado sobre resposta imunológica desencadeada através da infecção por *P. vivax* é essencial. Esses dados poderão contribuir para um desenho racional de uma vacina, tendo como base a proteína AMA1 de *Plasmodium vivax*.



6. EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT HUMAN WNT SIGNALING MODULATORS FOR FUNCTIONAL ANALYSIS

Schwarzer, A.C.A.P., Santos, D.C.M., Zanchin, N.I.T., Carneiro, F.R.G.

Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Paraná, Brasil

Wnt proteins comprise a large family of secreted signaling glycoproteins that regulate body-axis specification, morphogenesis, tumor development, metastasis, cell proliferation, differentiation, senescence and death. Dysregulation of Wnt pathways has been implicated in many types of cancer, including different types of leukemia. Activation and repression of Wnt signaling pathways are determined by interactions between these proteins and different membrane receptors and secreted modulators, such as DKK3 and SFRP2, which can play a role on tumor promotion or suppression depending on the cellular context. The aim of this work is to obtain recombinant DKK3 and SFRP2 proteins for functional studies. For this purpose, the cDNAs encoding human DKK3 and SFRP2 were subcloned into the pIRES2-EGFP vector (Clontech) with a C-terminal His-tag. This vector allows simultaneous expression of the protein of interest and of a reporter protein (EGFP) from a single bicistronic mRNA transcript. EGFP translation is driven by an internal ribosomal entry site (IRES) and serves as reference for transfection efficiency using fluorescence microscopy. Expression of both proteins was tested in HEK293T, MDCK and CHO cell lineages following transfection with Lipofectamine. Transient expression of DKK3 and SFRP2 was examined 24, 48, 72 and 96 h after transfection. Cell cultures were maintained in low-serum medium in order to reduce the contaminants in the supernatant to facilitate purification of the recombinant proteins. Expression levels of DKK3 and SFRP2 were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot. The highest expression levels for both proteins were observed in HEK293T cells at 72 h after transfection. Purifications were performed by affinity chromatography using nickel or heparin columns (GE Healthcare). SFRP2 and DKK3 have been partially purified and good purity levels for SFRP2 protein were obtained. We concluded that the expression system was efficient to produce both recombinant proteins in the amounts needed for functional assays. Optimization of purification protocols for both proteins is in progress in order to achieve the DKK3 and SFRP2 purity grade required for the planned functional studies.

Acknowledgements: We would like to thank Carlos Chagas Institute and FIOCRUZ for facilities and reagents, and CNPq for financial support.



7. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO RS731236 DO GENE *VDR* EM EURO-BRASILEIROS COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1.

Ana Karla Bittencourt Mendes, Maria Eduarda Maul-Araújo, Danielly Roesler, Liliane De Paula Silva, Mauren Isfer Anghebem-Oliveira, Dayane Alberton, Geraldo Picheth, Fabiane Gomes de Moraes Rego

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

E-mail: akmendes29@hotmail.com

Introdução: O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença global com incidência crescente e com potenciais sérias complicações. O DM1 é causado por um processo auto-imune crônico o qual leva à destruição de células beta pancreáticas com consequente deficiência de insulina. O colecalciferol (vitamina D3, VD3) é um fator ambiental e genético na patogenia do DM1. Foram encontrados polimorfismos em cada etapa do metabolismo da VD3, sendo que um deles envolve o receptor de VD3 (*VDR*). O rs731236 consiste da troca de G>A e está localizado no exon 9 do gene *VDR* (12q13.11). O objetivo deste estudo foi associar as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs731236 no gene *VDR* em amostras de indivíduos saudáveis (controle) e pacientes com diabetes tipo 1 (DM1), ambos Euro-Brasileiros e adultos.

Material e métodos: Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE 01038112.0.0000.0102. O polimorfismo rs731236 foi genotipado, utilizando sondas fluorescentes (TaqMan), em 280 indivíduos, sendo 145 indivíduos saudáveis (controle) e 135 indivíduos DM1 \geq 18 anos, classificados pelos critérios das Sociedade Brasileira de Diabetes (2015) e Associação Americana de Diabetes (2017).

Resultados: O polimorfismo analisado está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não houve diferença estatística significativa na comparação dos genótipos e frequências alélicas ($P=0,105$) entre os grupos para os modelos codominante e dominante, $P=0,056$ e $P=0,525$, respectivamente. O modelo recessivo mostrou significância ($P=0,017$), sugerindo que a presença do alelo G poderia estar associado à proteção em relação ao DM1. As frequências genotípicas (%) para os grupos controle e DM1 respectivamente foram GG (43,4) / GA (49,0) / AA (7,6) e GG (39,8) / GA (43,3) / AA (16,9), com valor de $P=0,056$. A frequência do alelo menor (MAF, % e 95%IC) foi 32,1 (27-37) e 38,6 (33-44) em indivíduos saudáveis e com DM1, respectivamente ($P=0,105$). O MAF obtido para o rs731236 foi semelhante aos valores encontrados na população europeia (43,8%).

Conclusão: O polimorfismo rs731236 no gene *VDR* não foi associado ao DM1 na população de adultos Euro-Brasileiros estudada.

Fonte financiadora: Fundação Araucária; CNPq



8. CARACTERIZAÇÃO E TESTE DE NOVOS SISTEMAS DE TRANSPOSIÇÃO PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM CÉLULAS CHO-S

Ana Luisa Kalb Lopes^{1,2}, Rafael Kessler¹, Adriana Ludwig¹, Marco Aurelio Krieger¹.

¹ Instituto de Biologia Molecular do Paraná, IBMP.

² Universidade Federal do Paraná.

E-mail: analuisa_kalb@hotmail.com

O cultivo de células mamíferas tem se tornado um sistema dominante para a produção de proteínas com aplicações clínicas devido a sua capacidade de realizar um sofisticado processamento pós-traducional bem como dobramento e montagem das proteínas de maneira autêntica. Atualmente, cerca de 70% de todas as proteínas terapêuticas são produzidas em células CHO. Transposons de DNA são elementos genéticos móveis que codificam uma enzima Transposase, a qual reconhece repetições terminais invertidas (TIRs) encontradas nas extremidades do elemento e catalisa a sua excisão e reintegração em outra posição dentro do genoma. Eles podem ser vistos como veículos naturais de transferência de DNA, sendo muito utilizados como ferramentas de engenharia genética. Nesses sistemas, um DNA de interesse clonado entre as TIRs de um vetor baseado em transposição pode ser usado para inserção genômica mobilizado por uma Transposase suplementada na forma de um plasmídeo de expressão ou de mRNA sintetizado *in vitro*. O primeiro sistema desenvolvido para vertebrados foi o *Sleeping Beauty*, um elemento inativo isolado de peixes salmonídeos, em 1997. Desde então, vários outros transposons de diferentes espécies têm se mostrado ativos em vertebrados. O objetivo principal deste projeto é testar novos transposons para o aprimoramento de um sistema de transposição para expressão eficiente de proteínas recombinantes em células CHO-S. Para esse propósito, um estudo inicial foi realizado analisando centenas de transposases no qual foram selecionadas 9 candidatas para o trabalho.



9. POSSÍVEL ENVOLVIMENTO DA COX-2 COMO MECANISMO CITOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DE EXTRATO DE *ASPIDOSPERMA SUBINCANUM*

Andressa Flores Santos¹, Regiane Stafim da Cunha², Mariana Campos Atherino¹, Cristiane Loiva Reishert¹, Almeriane Maria Weffort-Santos¹, Andréa Emília Marques Stingham², Rozangela Curi Pedrosa³, Cid Aimbiré de Moraes Santos⁴, Wesley Maurício de Souza¹, Karina Bettega Felipe¹

¹ Universidade Federal do Paraná, Departamento de Análises Clínicas

² Universidade Federal do Paraná, Departamento de Patologia Básica

³ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica

⁴ Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia

E-mail: andressaflores@ufpr.br

Fármacos obtidos por meio de plantas medicinais e seus metabólitos secundários têm sido direcionados ao tratamento do câncer, um dos exemplos mais importantes é o uso de alcaloides indólicos como agentes antitumorais. A *Aspidosperma subincanum* trata-se de uma espécie rica nestes compostos e que apresenta atividade antiinflamatória. Células tumorais superexpressam COX-2, esta enzima, ao ser ativada, induz resistência à apoptose além de promover a ocorrência de angiogênese e metástase. Assim, fica evidente que alguns agentes antiinflamatórios podem apresentar efeito antitumoral. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito citotóxico e antiproliferativo *in vitro* de extrato de *Aspidosperma subincanum* (EAT) em linhagem de câncer de mama MCF7, o qual foi verificado primeiramente através dos ensaios de MTT e NRU. O tipo de morte celular induzida foi determinada por microscopia de fluorescência, utilizando a coloração diferencial de Iodeto de Propídeo e Laranja de Acridina. Por fim, a correlação do efeito antiinflamatório e antitumoral foi verificada através de interferências na expressão da enzima COX-2, avaliada pela técnica de PCR em tempo real. Para a avaliação do efeito citotóxico/antiproliferativo, bem como para avaliação da expressão da COX-2 usou-se o alcalóide indólico vincristina (VC) e meloxicam (M) como controle positivo, respectivamente. Os resultados foram expressos em média \pm desvio-padrão e avaliados pela análise de variância ANOVA complementada pelo teste de Bonferroni, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo, $p < 0,05$. EAT reduziu significativamente a viabilidade mitocondrial ($IC_{50EAT} = 32 \pm 1,2$; $IC_{50VC} = 0,014 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$) e lisossomal ($IC_{50EAT} = 42 \pm 1,8$; $IC_{50VC} = 0,023 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$), quando comparado ao controle negativo (CN- tratamento com veículo de diluição de EAT), considerado como 100 % de viabilidade. A microscopia de fluorescência revelou que o tipo de morte celular induzida por EAT, trata-se de apoptose (CN=; EAT= $46,37 \pm 0,06$; VC= $64,05 \pm 0,03$). Por fim, a técnica de PCR em tempo real mostrou que EAT e M não expressaram a enzima COX-2. Os resultados permitem concluir que EAT promoveu efeito citotóxico e antiproliferativo em células MCF7, evidenciando seu potencial antitumoral, o qual pode ser associado à sua atividade antiinflamatória.

Apoio Financeiro: CAPES



10. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA DNA POLIMERASE TERMOESTÁVEL DERIVADA DE *Thermococcus kodakaraensis* (KOD)

Anna Caroline Gogola Muller; Luis Gustavo Morello; Stenio Perdigão Fragoso

annacgmuller@gmail.com

A enzima DNA polimerase é responsável pela síntese de DNA e, além do papel fundamental na manutenção da integridade da informação genética durante a replicação e reparo do DNA, as DNA polimerases são utilizadas como aliadas da biotecnologia, em ensaios como amplificação de DNA e sequenciamento. A técnica de reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*, PCR) é amplamente utilizada em ensaios de biologia molecular, pois através dela pode-se amplificar exponencialmente fitas de DNA, gerando milhares de cópias de um fragmento de interesse. Termo-estabilidade, alta taxa de extensão e alta fidelidade são propriedades desejadas nas DNA polimerases para assegurar a eficiência e confiabilidade dos resultados obtidos em experimentos realizados com essas enzimas. Em 1997, uma nova DNA polimerase termo-estável foi isolada do organismo hipertermofílico *Thermococcus kodakaraensis*, apresentando alta taxa de extensão e alta fidelidade. Entretanto, o valor comercial de DNA polimerases de alta fidelidade é geralmente alto, o que onera o orçamento laboratorial e, muitas vezes, faz com que outras enzimas de valor mais baixo e menor fidelidade sejam utilizadas, o que acaba comprometendo resultados de experimentos que requerem alta fidelidade. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é expressar, em *E. coli*, a DNA polimerase derivada de *T. kodakaraensis* (KOD) para uso em reações de PCR no ICC – Fiocruz/PR. O gene codificante para a DNA polimerase recombinante KOD foi clonado no vetor pET28a, expresso em *E. coli* em sua forma solúvel e mostrou atividade em reações de PCR. Os próximos passos incluem a purificação em larga escala e definição das condições ótimas de tampão e de reação para uso em reações de PCR.



11. CARACTERIZAÇÃO DO SECRETOMA CARDÍACO E SEU PAPEL NA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS

Anny Waloski Robert, Thamile Luciane Reus, Isabela Tiemy Pereira, Alessandra Melo de Aguiar, Bruno Dallagiovanna Muñiz, Marco Augusto Stimamiglio.

Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco – Instituto Carlos Chagas, Curitiba – PR – Brasil.

E-mail: annywr@hotmail.com

O microambiente tecidual, composto principalmente por fatores solúveis e matriz extracelular, é capaz de regular o comportamento celular, modulando perfis de adesão, proliferação, diferenciação, apoptose, entre outros. Há grande interesse em entender a composição dos diferentes nichos teciduais e como eles são capazes de modular as respostas em diferentes tipos celulares. Com relação ao nicho cardíaco ainda existem vários aspectos que precisam ser elucidados, como a caracterização dos sinais secretados que modulam o comportamento das células progenitoras residentes. Para tanto, diferentes abordagens para esclarecer esses sinais podem ser propostas, como avaliar as moléculas secretadas por células derivadas de tecido cardíaco adulto ou durante o processo de diferenciação cardiomiogênica no período embrionário. Assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar a composição proteica e avaliar possíveis efeitos biológicos do secretoma (meios condicionados - MCs - derivados de cultivo) de células residentes cardíacas ou de células-tronco embrionárias em diferentes momentos do processo de diferenciação cardiomiogênica. Em relação ao secretoma das células residentes cardíacas isoladas, análises proteômicas apontam a presença de uma complexidade de proteínas e fatores solúveis. Ensaio funcionais com células progenitoras em cultivo demonstraram que o secretoma das células residentes cardíacas é capaz de influenciar a proliferação e diferenciação de cardioblastos murinos (H9c2) e de células progenitoras endoteliais humanas. Outro foco do trabalho é entender as alterações do microambiente e das sinalizações durante o comprometimento celular à linhagem cardíaca. Para isso, coletamos os MCs em diferentes pontos durante o processo de diferenciação cardiomiogênica de células-tronco embrionárias (D1, D4, D8 e D15 – referentes aos dias de diferenciação e surgimento de progenitores). A caracterização proteômica por espectrometria de massas está sendo realizada nos MCs assim como na matriz extracelular secretada pelas células durante o processo de diferenciação. Experimentos iniciais com células H9c2 apontam que os MCs não são tóxicos e que estes, em momentos iniciais da diferenciação (D1, D4 e D8), possuem a capacidade de aumentar a taxa de proliferação dessas células. Resultados similares foram verificados com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, porém apenas os meios dos tempos D1 e D4 induziram diferença significativa na proliferação em relação aos demais meios. Ensaio adicionais estão sendo realizados para verificar a influência dos MCs (D8 e D15) na diferenciação cardíaca de células H9c2 e de progenitores cardíacos humanos.



12. CÂNCER DE MAMA: TCTP COMO ALVO TERAPÊUTICO

Antonielle Beatriz Baldissera; Andrea Senff-Ribeiro

Universidade Federal do Paraná

E-mail: antonielle.baldissera@outlook.com

Introdução: A proteína TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) desempenha um importante papel no processo de reversão tumoral, além de ser considerada molécula alvo na terapia do câncer. Já foi demonstrado que a sertralina, antidepressivo inibidor da recaptação de serotonina, é capaz de diminuir os níveis intracelulares de TCTP e inibir o crescimento tumoral. Em tumores de mama, considerados a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, estudos sobre TCTP mostram que a expressão da proteína é relevante para o fenótipo maligno e sua alta expressão está associada a um prognóstico ruim. A partir disso, o objetivo do trabalho foi aprofundar o entendimento do papel biológico da TCTP em diferentes subtipos de tumores de mama (linhagens MCF7, PMC-42, MDA-MB-231 e MDA-MB-436) avaliando os efeitos da sertralina. Metodologia: As quatro linhagens de mama utilizadas representam subtipos diferentes: PMC 42 (fenótipo similar ao de células-tronco tumorais), MCF7 (luminal A, hormônio dependente), SKBR-3 (superexpressão de HER2), MDA-MB-231 (triplo negativo) e MDA-MB-436 (triplo negativo). Todas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, as células foram tratadas com sertralina e submetidas aos ensaios de viabilidade celular, clonogenicidade (avaliar a capacidade de formação de colônias em meio semi sólido), migração (avaliar capacidade migratória) e imunodeteção (identificar a presença das proteínas TCTP e GAPDH- controle). As concentrações de sertralina estudadas foram de 1, 5 e 10 μM , com exceção do ensaio de clonogenicidade que utilizou as concentrações de 0,1, 1 e 5 μM . Em todos os experimentos foram utilizados os controles: somente meio de cultura e meio de cultura contendo o solvente de sertralina (DMSO). Resultados e Discussão: A sertralina diminuiu os níveis de TCTP e apresentou efeitos antitumorais em todas as linhagens estudadas. As linhagens MCF7 e PMC 42 foram bastante sensíveis ao tratamento, com grande diminuição das características fenotípicas tumorais. Destacamos também os resultados obtidos com a linhagem PMC 42, que apresenta características de célula tronco tumoral, cujos resultados mostram-se bastante susceptibilidade à sertralina. Para as linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-436, representantes do subtipo triplo negativo, o qual apresenta fenótipo agressivo e é pouco responsivo aos tratamentos disponíveis, observou-se significante diminuição da migração e da clonogenicidade celular. Portanto, os resultados obtidos evidenciam os efeitos da sertralina e da inibição da proteína TCTP nas diferentes linhagens de tumor de mama. Portanto, sugere-se que o uso da sertralina, combinada com as estratégias terapêuticas atuais em câncer de mama, é uma possibilidade terapêutica promissora. Especialmente naqueles subtipos menos responsivos clinicamente e com grande chance de resistência, como os triplo-negativos. Conclusão: Os resultados obtidos no trabalho corroboram com dados da literatura que apontam a TCTP como alvo terapêutico e a sertralina como estratégia



clínica possível e interessante para superar as dificuldades de resistência clínica. Em todas as linhagens tratadas observa-se o nítido efeito do tratamento de sertralina sob as células, indicando que o uso desta, junto com quimioterápicos específicos, pode ser de grande auxílio no tratamento do câncer. Os resultados das linhagens triplo negativo são bastante relevantes uma vez que este subtipo de tumor de mama apresenta-se refratário às terapias atualmente empregadas



13. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS) PROVENIENTES DE FONTES RENOVÁVEIS

Ariane Caroline Campos Paschoal¹, Crisciele Kuligovski^{1 3}, Luciano Panagio², Gerson Nakazato², Guilherme Fonseca Reis², Thamile Luciane Reus³, Bruno Dallagiovanna¹, Ana Paula Ressetti Abud¹, Alessandra Melo de Aguiar¹

¹ Instituto Carolos Chagas – FIOCRUZ/PR

² Universidade Estadual de Londrina

³ Universidade Federal do Paraná

⁴ Instituto de Biologia Molecular do Paraná

E-mail: arianepaschoal@hotmail.com

Introdução: Nos estudos em nanotecnologia, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm grande destaque, sendo caracterizadas como um dos nanomateriais com maior número de produtos no mercado. Destacam-se pela sua atividade germicida, com efeito comprovado contra bactérias, fungos e alguns vírus. O processo sintético de nanopartículas (NPs) ocorre principalmente de forma físico-química, tendo potencial de gerar subprodutos perigosos e requerendo um alto consumo energético. Como alternativas de fontes promissoras foram realizados estudos com recursos biológicos, os quais relatam a contribuição dos micro-organismos na produção das NPs metálicas. Dentre esses sistemas a bioprodução por fungos tem grandes vantagens práticas, principalmente por sua tolerância aos metais e capacidade de bioacumulação. Entretanto, pouco se sabe sobre a segurança e toxicidade das AgNPs em relação à saúde humana e animal, principalmente das AgNPs biológicas. Portanto, para avaliar o potencial tóxico das NPs foi utilizada a metodologia já validada de citotoxicidade por captação do corante vermelho neutro. Espera-se que através desse teste seja possível estipular o efeito dose-resposta de AgNPs de síntese biológica em comparação com AgNPs de síntese química, podendo delimitar concentrações seguras que possibilitem regulamentar seu uso, além de definir se o efeito tóxico varia em função do processo de síntese. **Metodologia:** As AgNP_{BIO} foram sintetizadas pelo laboratório de microbiologia da Universidade Estadual de Londrina utilizando o método de biossíntese pelo fungo *Fusarium oxysporum* (Patente, 2006, PI0605681). Já as AgNP_{QUI} foram obtidas comercialmente (SIGMA ALDRICH® Saint Louis, USA). As AgNP foram caracterizadas por espectrometria UV/VIS, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para avaliar o potencial tóxico das partículas foi utilizada a metodologia de citotoxicidade por captação do corante vermelho neutro sobre células Balb 3T3 clone A31 (Banco de células do Rio de Janeiro) seguindo a OECD 129. **Resultados e Discussão:** A análise por MET mostrou que AgNP_{QUI} são maiores e mais concentradas que as AgNP_{BIO} e que ambas têm morfologia predominantemente esférica e tamanho heterogêneo. Os dados de DLS corroboram a observação microscópica, mostrando a heterogeneidade e relatando um



tamanho médio para as AgNP_{QUI} de 97nm e para as AgNP_{BIO} de 56nm. A espectrometria UV/VIS mostrou um pico de absorção de 450nm para ambos os processos sintéticos e possibilitou a quantificação das nanopartículas, tendo uma concentração de 20.000µg/mL para AgNP_{QUI} e 550µg/mL para AgNP_{BIO}. Através do teste de citotoxicidade as AgNP_{QUI} apresentaram valores de IC₂₀ 104,51±39,99µg/mL, IC₅₀ 56,00±15,68µg/mL e IC₈₀ 28,24±8,37µg/mL. Já as AgNP_{BIO} apresentaram valores de IC₂₀ 1,83±0,22µg/mL, IC₅₀ 1,47±0,29µg/mL e IC₈₀ 1,16±0,40 µg/mL. Esses resultados indicam uma diferença significativa na toxicidade entre AgNP_{QUI} e AgNP_{BIO}, sendo fundamental avaliar outros lotes de AgNP_{BIO} a fim de confirmar os achados ora descritos. Conclusão: Os dados apresentados indicam uma diferença na toxicidade entre AgNP_{QUI} e AgNP_{BIO}, sendo as últimas aparentemente mais tóxicas, indicando um possível perfil toxicológico variando em função do processo de síntese. Novos ensaios serão realizados com novos lotes de AgNP_{BIO} além da avaliação dos mecanismos de ação envolvidos. Apesar da toxicidade identificada, as AgNP_{BIO} ainda são consideradas ambientalmente e economicamente mais favoráveis que as obtidas pelos métodos de síntese físico-químicos. Além disso, estudos apontam que o potencial antimicrobiano de AgNP_{BIO} é superior aos demais métodos de síntese, sendo encontrado doses bactericidas cerca de 10 vezes mais potentes, se mostrando vantajosas para aplicação industrial.

Fonte financiadora: CAPES, Fundação Araucária, CNPq, Fiocruz.



14. ANTI-EGF ANTIBODY SEQUENCING FOR IN-VITRO MATURATION

Arthur Schweitzer Ferreira^{1, 2}, Beatriz Gomes Guimarães^{1, 2}, Fabricio Klerynton Marchini², Nilson Ivo Tonin Zanchin^{1, 2}

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná

² Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ/PR

E-mail: nizanchin@fiocruz.br

INTRODUCTION: Lung cancer is one of the leading causes of cancer deaths worldwide. Change in the levels of epidermal growth factor (EGF) is among the variables of lung cancer development, however, its value as a biomarker has not been confirmed yet. In the group of technologies available for EGF detection and quantification are antibodies and its derivatives, which need to have high sensitivity and avidity due to the low levels of EGF in blood samples. Maturation is a promising strategy for optimizing interaction of antibodies with its target. Since there is no anti-EGF antibody sequence available, we started up by sequencing commercially available EGF antibodies with no legal restriction for this type of utilization. The final sequences are going to be improved using computational predictions and affinity measurements.

METODOLOGY: Two monoclonal antibodies were acquired, one originated from *Mus musculus* and another from *Oryctolagus cuniculus*. Both were digested for one hour with trypsin, endoproteinase Asp-N and endoproteinase Glu-C for mass spectrometry analysis on an Orbitrap-LTQ XL spectrometer. The fragmentation method chosen was collision induced dissociation. The quality of the sequences was evaluated based on a combination of parameters such as quality of peptide fragmentation, coverage, sequence conservation, among others. The spectra were analyzed using PEAKS Studio 7.5 software. The maximum error accepted was 20 ppm and 0.2 Da for each fragment from these peptides. Nonspecific digestions of up to four points per peptide and three maximum chemical modifications per peptide were accepted, with the modifications allowed being carbamidomethylation, acetylation and oxidation. Mouse and rabbit antibody sequence frameworks were assembled for the conserved regions and peptide overlapping was used to facilitate reconstitution of the amino acid sequences. The strategy adopted for the murine antibody was peptide mass fingerprinting, using sequences coming from the National Center for Biotechnology Information and from the Protein Data Bank. The strategy adopted for the rabbit antibody was similar with extra steps of de novo sequencing for the regions not covered in the framework sequence.

RESULTS AND DISCUSSION: Both light chain sequences were completely reconstituted with high confidence. The heavy chain of the mouse antibody was obtained with two gaps at positions K66 and C217 which lie in conserved regions of the framework. The heavy chain of the rabbit antibody was obtained with gaps at positions I20, S21 and C22. Considering that the number and positions of the cysteine residues indicate that it belongs to the IgG isotype 3, for gene synthesis we used the conserved sequence of the IgG isotype 3 framework and inserted a cysteine residue at position 22.



The non-covered residues probably were lost due to the proteolytic points being in residues too close for trypsin and too far apart from the other two enzymes. The final amino acid sequences were used to design synthetic genes for recombinant antibody expression. **CONCLUSION:** The recombinant antibodies will be used for affinity measurements and structural studies as initial steps of antibody maturation.



15. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA VIA DE SÍNTESE DE UDP-XILOSE EM *Trypanosoma cruzi*

Bárbara Moré Silva, Karolina Grzyb, Luana Matos Martins de Melo e Augusto S P Ramos*

Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

E-mail: aspramos@fiocruz.br

Introdução: O agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, afeta cerca de 7 milhões de pessoas na América Latina, com um número aproximado de 100 milhões de pessoas sob-risco de infecção. Os glicoconjugados atuam na interação hospedeiro-patógeno, em processos como a invasão da célula hospedeira e a modulação do sistema imunológico do hospedeiro mamífero. Os açúcares presentes em *T. cruzi* e em outros tripanosomatídeos incluem manose, glicosamina, glicose, galactose e outros, porém apenas *T. cruzi* apresenta resíduos de xilose. A síntese de UDP-xilose a partir de UDP-glicose envolve duas etapas que são mediadas pelas enzimas UDP-glicose desidrogenase (UGD) e UDP-ácido glucurônico descarboxilase (UXS). O objetivo do projeto é o estudo da via de síntese de UDP-xilose, através da caracterização cinética das enzimas TcUGD e TcUXs. **Metodologia:** Os genes que codificam as enzimas TcUGD e TcUXS foram clonados por recombinação nos vetores de expressão em sistema bacteriano pDEST17 (em fusão com uma cauda de histidinas) e pDEST 15 (em fusão com a proteína glutatona S transferase (GST)) da plataforma Gateway (Invitrogen). Ensaios de expressão foram realizados em diversas cepas de *Escherichia coli* a 37°C por 3h e a 25°C *overnight*, com adição de IPTG 1mM. A expressão das proteínas foi verificada por gel de SDS-PAGE e Western blotting e os ensaios bioquímicos de atividade das enzimas purificadas serão feitos por HPLC. **Resultados e Discussão:** Os testes de indução para as proteínas fusionadas a cauda de histidinas foram negativos em todas as cepas testadas em ambas as temperaturas. No entanto observamos claramente a indução de TcUGD em fusão com GST a 37°C, porém com pouca intensidade. A expressão da proteína foi confirmada por Western blotting. Como o resultado do teste foi positivo, verificamos a solubilidade proteica por meio da sonicação dos extratos obtidos dos ensaios de expressão. No entanto, verificamos que a proteína está presente na fração insolúvel. **Conclusão:** A expressão de TcUGD foi observada apenas fusionada a GST a 37°C, na fração insolúvel. Como os ensaios bioquímicos exigem a proteína solúvel, faremos o teste de indução em temperaturas menores (16°C e 25°C). Se a proteína ainda se apresentar em corpos de inclusão, tentaremos realizar a sua expressão na levedura *Pichia pastoris*. Em relação à TcUXS, estamos realizando os ensaios de indução da expressão da proteína fusionada a GST.

Fonte Financiadora: Fiocruz, CNPq e Fundação Araucária.



16. EXPRESSÃO DE RNAs NÃO CODIFICANTES LONGOS (LNCRNAs) NO INÍCIO DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO

Bernardo Bonilauri^{1,2}, Isabela T. Pereira¹, Lucía Spangenberg³, Bruno

Dallagiovanna^{1,2}

¹ Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco, Fiocruz-PR

² Universidade Federal do Paraná

³ Unidade de Bioinformática, Instituto Pasteur de Montevideo

Introdução: RNAs não codificantes longos (*lncRNAs*) possuem um importante papel na regulação transcricional e pós-transcricional. São classificados como transcritos maiores que 200 nucleotídeos, sendo achados tanto no núcleo como no citoplasma. Diversos trabalhos tem descrito a associação dos *lncRNAs* com a maquinaria polissomal e novos estudos tem demonstrado a participação destes *lncRNAs* na diferenciação celular, porém pouco se compreende a cerca da dinâmica e mecanismos nos processos de diferenciação de células-tronco. **Metodologia:** Neste trabalho, utilizamos sequenciamento em larga escala (RNA-seq) tanto da fração total, quanto dos RNAs associados aos polissomos através da técnica de *polysome profile* de células-tronco adultas (CTAs) derivadas de tecido adiposo submetidas a 24h de diferenciação osteogênica e adipogênica, com o intuito de estudar o perfil de expressão dos *lncRNAs* logo no disparo inicial da diferenciação. **Resultados:** Verificamos que após a indução osteogênica, 46 *lncRNAs* foram diferencialmente expressos (DE) na fração total, sendo 29 *up*-regulados e 17 *down*-regulados, enquanto 73 *lncRNAs* DE na fração polissomal, sendo 49 *up*-regulados e 24 *down*-regulados. Onde 65,3% e 67,6% dos *lncRNAs* possuem tamanho entre 200 e 1000 nucleotídeos na fração total e 63,1% e 77,9% na fração polissomal, respectivamente. Em relação a indução adipogênica, constatamos que 76 *lncRNAs* diferencialmente expressos na fração total, sendo 57 *up*-regulados e 19 *down*-regulados, e 89 *lncRNAs* na fração polissomal, sendo 46 *up*-regulados e 43 *down*-regulados. Na fração total 67,2% e 64% dos transcritos apresentaram tamanho entre 200 e 1000 nucleotídeos, respectivamente. Já na fração polissomal este número foi de 71,5% e 67,4%. A distribuição cromossômica destes *lncRNAs* diferencialmente expressos tanto na osteogênese quanto na adipogênese foi bastante heterogênea. Após diferentes análises (tipo de *lncRNA*, número de exons por transcrito, potencial codificador de proteínas, conteúdo G-C) selecionamos para analisar os *lncRNAs up*-regulados nas duas diferenciações e pudemos avaliar que 18 transcritos são exclusivos da fração total osteogênica e 46 transcritos da adipogênica, onde apenas 11 *lncRNAs* são compartilhados. Já em relação a fração polissomal verificamos 35 transcritos somente da diferenciação osteogênica e 32 transcritos da adipogênica, sendo apenas 14 comuns entre eles. Isso nos indica uma grande especificidade na expressão de *lncRNAs* relacionados a diferenciações distintas.



LncRNAs associados a polissomos foram selecionados e serão avaliados durante todo o processo de diferenciação osteogênica e adipogênica (24h, 72h, 7 dias, 14 dias e 21 dias) através de qRT-PCR. Estes mesmos *lncRNAs* serão avaliados através da técnica de *polysome profile* com adição de puomicina, com o objetivo de comprovar a associação aos polissomos. **Conclusão:** Mediante sequenciamento em larga escala identificamos a população de *lncRNAs* expressos nas CTAs não diferenciadas e nos estágios iniciais de diferenciação adipogênica e osteogênica. Foram identificados *lncRNAs* com expressão diferencial no início da diferenciação celular tanto na fração total como polissomal de RNA. Nossos dados corroboram com outros estudos que demonstram a associação de *lncRNAs* aos polissomos. Estes *lncRNAs* podem estar agindo através de uma regulação pós-transcricional como reguladores de microRNAs e mRNAs, exercendo um papel crucial nos processos de diferenciação celular.



17. EXOME SEQUENCING ANALYSIS IDENTIFIES POSSIBLE CAUSAL MUTATIONS IN A BRAZILIAN FAMILY WITH STARGARDT DISEASE.

Bianca Ribeiro Pizzato^{1*}; Roberto Rosati^{2*}; Naoye Shiokawa³; Mario Teruo Sato^{3,4}; Ana Beatriz Oliveira Villela Silva¹; Maria Luiza Petzl-Erler¹; Angelica Beate Winter Boldt¹; Rodrigo Coutinho Almeida¹.

¹Laboratory of Human Molecular Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

²Institute of Research Pelé Pequeno Príncipe and Faculty Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil.

³Eye Clinic Retina and Vitreo Consulting, Curitiba, Brazil.

⁴Department of Ophthalmology/Otorhinolaryngology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

* both authors contributed equally to this work

Objective: To identify possible causal mutations in a Brazilian family with four sisters affected with Stargardt disease (STGD1) by performing whole exome sequencing (WES), integrated with deep phenotype characterization (complete ophthalmologic examination). **Methodology:** We performed WES of the two affected sisters with more severe symptoms, using Ampliseq technology for library preparation, sequencing with the IonProton platform, alignment and mapping with TMAP software. Based on variant annotations of the ANNOVAR and Ion Reporter programs, we evaluated mutations in all candidate genes and applied standard filtering steps (excluding variants in regulatory and intergenic regions, and synonymous variants, as well as variants with MAF > 0.01). Exclusively for the *ABCA4* and *RDH11* genes variants with a MAF higher than 0.01 were considered. We also filtered the variants according to the results from algorithms that predict the effect of nucleotide change as PolyPhen-2, SIFT, Mutation Taster, FATHMM and Mutation Assessor, and verified pathogenicity of candidate variants in the Clinvar database. To prioritize candidate genes and variants, we also used The Exomiser algorithm, including variants in possible modulatory genes potentially responsible for variable disease expression. We searched for filtered mutations with high-quality reads (evaluated on IGV software) in 14 family members by Sanger sequencing, for further validation. **Results and discussion:** We identified around 55,330 variants in both patients. After data filtering and analysis, we prioritized nine candidate variants, three of which were present in the *ABCA4* gene, the major STGD1 candidate gene. Although none of the variants occur in other candidate STGD-associated genes (*CNGB3*, *ELOVL4*, *PROM1*, *PRPH2* and *BEST1*), there were six heterozygous mutations present in genes associated with retinal dystrophies (listed in RetNet). Among them, only the variant in the *TLR4* gene was not previously described in dbSNP (MAF 0.0001 in the South Asian population/ExAC Browser). We successfully verified all candidate variants identified by WES using Sanger sequencing in the affected sisters,



including one additional affected second-degree relative. All four sisters were heterozygotes for two *ABCA4* missense mutations (MAF 0.00004 in the European Non-Finnish population/ExAC Browser and MAF 0.0306 in the worldwide population/ExAc Browser), as well as for one *RDH11* missense mutation (MAF 0.0163 in the worldwide population/ExAc Browser). Interestingly, only the *RDH11* and the rare *ABCA4* mutations were predicted to be pathogenic. A first-degree cousin of their mother was homozygous for the rarer *ABCA4* variant and presented late onset of the disease. He had one deceased affected brother with the same phenotype. Given the essential activity of *ABCA4* and *RDH11* in the visual cycle, it might be possible that they are causing STGD1 on our patients. Conclusion: The rarer *ABCA4* variant in a homozygous state potentially causes a late onset of STGD1. Our results suggest the presence of alleles not yet identified and/or the involvement of additional putative genes that may account for the pathogenesis of STGD1. Therefore, we propose that the combination of heterozygous mutations in the *ABCA4* and *RDH11* genes could be the causative mutations of STGD1. We hypothesize an additive gene interaction between those genes and possibly a digenic inheritance of STGD1 in this family. Once there is no medication for STGD, we expect that the recognition of pathogenic variants will indicate new targets for possible gene therapy in the future.

Financial support: CAPES, CNPq, Young Talent Fellowship Awards, Science without Borders Program. Clínica de Olhos Vitreo e Consultoria de Curitiba.



18. EFEITO DO ÓLEO DE PEIXE SOBRE O PERFIL LIPÍDICO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO VISCERAL DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS À PROGRAMAÇÃO METABÓLICA POR REDUÇÃO DE NINHADA

Bruna Aparecida Comotti de Oliveira¹, Stefani Valeria Fischer², Igor Pedroso², Dagliane Daneluz Pagliosa², Debora Sales Silva Coutinho², Luiz Cláudio Fernandes², Marcia Helena Appel³, Katya Naliwaiko¹

¹ Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular e Molecular (PARANÁ, Brasil)

² Universidade Federal do Paraná, Departamento de Fisiologia (PARANÁ, Brasil)

³ Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética (PARANÁ, Brasil).

E-mail: brunacomotti89@gmail.com

INTRODUÇÃO: A obesidade aumentou substancialmente ao longo das últimas três décadas e é considerada como um dos mais graves problemas de saúde do século XXI. O sobrepeso e obesidade são definidos como o acúmulo de gordura abdominal anormal ou excessivo que apresente risco à saúde. O modelo da programação metabólica por redução de ninhada é um modelo que propõe a partir de interferências em períodos críticos do desenvolvimento reproduzir em animais condições ambientais as quais humanos também podem ser expostos. A redução de ninhada no terceiro dia pós-natal é amplamente usada como modelo de supernutrição para estudos de obesidade. Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI's) EPA e DHA da família ômega 3 presentes no óleo de peixe, possuem ação anti-inflamatória, participam de vários mecanismos celulares mediados por membrana, podendo atuar em cascatas bioquímicas e na regulação da expressão gênica, uma vez incorporados na forma de fosfolipídios de membrana. Desta forma, a suplementação com óleo de peixe, reduz o risco de doenças crônicas estabelecidas pelo processo inflamatório, como a obesidade. **METODOLOGIA:** Foram utilizados ratos machos Wistar a partir do acasalamento de fêmeas e machos adultos (90 dias). Após o nascimento das ninhadas, todas as ninhadas foram padronizadas com 10 filhotes. No terceiro dia pós-natal, para a formação do grupo obeso (OB) as ninhadas foram reduzidas a 3 filhotes, e as ninhadas controles permaneceram com 10 filhotes. Aos 21 dias pós-natal ocorreu o desmame das ninhadas e os grupos foram divididos em: Obeso (OB, 3 filhotes) e Obeso Suplementado (OBS, 3 filhotes), Controle (C, 10 filhotes) e Controle Suplementado (CS, 10 filhotes). A suplementação oral com óleo de peixe (1g/kg/dia), em cada cápsula continham 180 mg de EPA e 120 mg de DHA, o tempo de suplementação foi de 21 a 60 dias quando os animais foram eutanasiados e coletadas as amostras. A evolução da massa corporal dos filhotes foi avaliada durante o período de lactação semanalmente com 7, 14 e 21 dias de idade dos filhotes. Após o desmame a massa corporal foi avaliada três vezes por semana, até a idade de 60 dias. Aos 60 dias foram dissecados os tecidos adiposos viscerais retroperitoneal e perigonadal, posteriormente foi



analisado o perfil lipídico desses tecidos por detecção em cromatógrafo líquido de alta precisão (HPLC), e os ácidos graxos foram injetados em cromatógrafo líquido Varian Pró-Star. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Durante o período de lactação o ganho de massa corporal dos animais do grupo (OB) mostrou-se significativamente maior desde o sétimo dia, em 21,09 %, aos 14 e 21 dias, 33,23 % e 25,82 % respectivamente em relação ao grupo (C), caracterizando o modelo de obesidade. Aos 60 dias o ganho de massa corporal do grupo (OB) foi 19,07 % maior que o grupo (C). O perfil lipídico do tecido adiposo retroperitoneal mostrou um aumento do ácido graxo araquidônico em 68 % no grupo (OB) quando comparado ao grupo (C). Porém nos grupos suplementados, (CS) e (OBS) foi detectado o AGPI DHA, 46 % e 53 % maior nos grupos (CS) e (OBS) respectivamente quando comparado ao grupo (C). No tecido adiposo perigonadal, foi detectado o AGPI DHA, 87 % e 115 % maior nos grupos (CS) e (OBS) respectivamente quando comparados ao grupo (C) e os níveis do AGPI EPA foi 114 % e 67 % maior nos grupos (CS) e (OBS) respectivamente quando comparados ao grupo (C). **CONCLUSÃO:** O período de suplementação mostrou-se eficiente para a incorporação dos AGPI's EPA e DHA no tecido adiposo perigonadal e do AGPI DHA no tecido adiposo retroperitoneal. O aumento do ácido graxo araquidônico no tecido adiposo retroperitoneal do grupo (OB) mostrou o perfil inflamatório nesse tecido, o que caracteriza a obesidade.

Apoio: CAPES e CNPq.



19. CARACTERIZAÇÃO DE GRÂNULOS DE RNPM DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO E ANÁLISE DO SEU PAPEL DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Bruna Hilzendeger Marcon, Axel Helmut Rulf Cofré, Bruno Dallagiovanna Muniz, Alejandro Correa Dominguez.

Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR

E-mail: bruna.marcon@fiocruz.br

As células-tronco (CTs) possuem a capacidade de se autorrenovar e de dar origem a diferentes tipos celulares. A compreensão de como se dá a regulação da expressão gênica nas CTs é um passo importante para melhor aproveitar seu potencial. Na célula, existem diferentes proteínas que se associam ao RNAm, atuam na sua regulação e podem se acumular em regiões do citoplasma, formando os chamados grânulos de ribonucleoproteínas (RNPM). Dentre estes grânulos, estão os *P bodies*, os quais se caracterizam por possuírem proteínas envolvidas na degradação do RNAm, como Dcp1 e Rck. A caracterização destes grânulos em CTs e o conhecimento de sua dinâmica são importantes para a compreensão de como a expressão gênica é regulada nestas células. Estudos preliminares do nosso grupo demonstraram que a quantidade e o tamanho dos grânulos de RNPM em CTs adultas variam no início do processo de diferenciação. E, quando alguns dos componentes destes grânulos são silenciados, as células diferenciam mais rapidamente, o que sugere que estas estruturas participam do processo de diferenciação celular. Assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar o conteúdo proteico e de RNA de grânulos de RNPM de CTs obtidas de tecido adiposo humano e analisar o comportamento destes grânulos durante o processo de adipogênese assim como o papel na dinâmica traducional da célula. Para realização do trabalho, foram isoladas células de três doadores, as quais foram analisadas quanto à expressão de marcadores de CTs mesenquimais e quanto à sua capacidade de se diferenciar em diferentes fenótipos celulares (adipócitos e osteoblastos). Para análise do perfil traducional das hASCs, foi realizada a técnica de *polysome profiling* com as células controle e induzidas para diferenciação adipogênica por 24h. Por ontologia gênica, observou-se que, após 24h de indução, há um aumento da expressão de genes relacionados à diferenciação adipogênica e ao metabolismo de lipídeos, e uma regulação negativa de transcritos relacionados ao ciclo celular. Para confirmação destes dados, foi realizada análise de ciclo celular e de proliferação (citometria de fluxo) e foi confirmado que, após 24h de indução adipogênica, há realmente uma redução da proliferação das hASCs. Em seguida, será feita a análise da correlação entre os transcritos encontrados nos polissomos e os presentes em grânulos de RNPM, a fim de melhor entender a dinâmica entre estas estruturas no início da diferenciação adipogênica. Para isso, será feita a coimunoprecipitação de proteínas características de grânulos e do RNA associado a estes complexos. Até o momento, foi padronizado o protocolo para imunoprecipitação de Rck, uma helicase encontrada em *P bodies*; sendo que foi observado, por Western Blot, a coimunoprecipitação de Dcp1, que também é uma proteína característica deste tipo de grânulo. Para confirmação destes



dados, será feita análise por espectrometria de massa. Também foi feita uma caracterização inicial da expressão e localização de proteínas características de grânulos de RNPm (imunofluorescência). Esta análise foi feita com as células mantidas em meio controle e induzidas para adipogênese ou osteogênese por 24 horas. Observou-se que as CTs obtidas de tecido adiposo expressavam as proteínas Dcp1a e Rck e que estas também se acumulam em grânulos e que há uma redução na quantidade destes grânulos após 24 horas de indução para diferenciação. Este resultado sugere que estes grânulos podem estar envolvidos na regulação do início do processo de diferenciação celular.



20. POLIMORFISMO NO GENE *PAX4* (RS712701) EM CRIANÇAS COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1

Bruna Rodrigues Martins, Marciane Welter, Yusra Iahham, Louryana Campos, Mauren Isfer Anghebem-Oliveira, Dayane Alberton, Geraldo Picheth, Fabiane Gomes de Moraes Rego

Introdução: *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença metabólica crônica que afeta grande número de crianças e adolescentes. Corresponde cerca de 10% do número de diabéticos e tem aumentado em torno de 3% a cada ano. O DM1 resulta de uma combinação de predisposição genética e fatores ambientais, o que acarreta a ativação de células do sistema imune que promovem a destruição das células beta pancreáticas, levando a incapacidade de produção de insulina. Os genes *Pax* codificam para uma família de proteínas que atuam como fatores de transcrição, os quais possuem funções essenciais na organogênese durante o desenvolvimento embrionário, na regulação da proliferação celular, e na resistência à apoptose. O gene *PAX4* é considerado um fator transcricional essencial para a diferenciação e proliferação de células \square pancreáticas. Sua expressão estimula a proliferação e protege as células contra apoptose induzida por estresse. Mutações e polimorfismos que afetem a atividade transcricional de *PAX4* resultam na redução da proliferação das células \square pancreáticas e em apoptose destas células. **Objetivo:** Associar o polimorfismo rs712701 no gene *Pax4* com DM1 em uma população de crianças euro-brasileiras e correlacionar estas variações com os marcadores bioquímicos de perfil glicêmico (glicose, HbA1c, 1,5-AG), perfil lipídico (colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicérides), função renal (ureia, creatinina) e, dados clínicos das crianças estudadas (idade, peso, IMC, Z-score, histórico familiar de DM, histórico de cetoacidose diabética). **Material e Métodos:** Foi avaliado a associação do rs712701 no gene *Pax4* em um estudo tipo caso-controle em crianças Euro-Brasileiras com diabetes tipo 1 (DM1, n = 148) e crianças saudáveis (controle, n = 168). O projeto teve aprovação do comitê de ética da UFPR (CAAE: 24676613.6.0000.0102). A genotipagem do polimorfismo foi realizada através da técnica PCR em tempo real com sondas fluorescentes Taqman. **Resultados e Discussão:** Crianças com DM1 apresentaram Z-score significativamente menor ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. As concentrações séricas de glicemia em jejum, HbA1c, colesterol total, HDL, LDL, ureia e creatinina foram significativamente maiores no grupo com DM1. Entretanto, o grupo controle apresentou concentrações séricas significativamente maiores quanto a 1,5-AG, triglicérides, ácido úrico e proteínas totais. A frequência genotípica do polimorfismo analisado está em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Os grupos não apresentaram diferença significativa na distribuição genotípica ($P = 0,598$) ou alélica ($P = 0,742$). A frequência para o alelo raro do polimorfismo em estudo foi, no geral, similar aos descritos para outras populações europeias ou caucasoides e menores quando comparados às Orientais. **Conclusão:** O polimorfismo rs712701 no gene *PAX4* não foi associado ao DM1.



21.O PAPEL DAS PROTEÍNAS DEDO DE ZINCO TCZC3H39 E ZFP29 NO METABOLISMO DE RNA DO *Trypanosoma cruzi*.

Bruno Accioly Alves Romagnoli, Gisele Fernanda Assine Picchi, Priscila Mazzocchi Hiraiwa, Beatriz Santana Borges, Lysangela Ronalte Alves, Samuel Goldenberg

Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ Paraná, Curitiba, Brazil.

E-mail: baaromagnoli@gmail.com

A regulação da expressão gênica é essencial para que o *Trypanosoma cruzi* se adapte rapidamente às diferentes condições impostas pelos seus hospedeiros durante seu ciclo de vida. Nos tripanossomatídeos, esse controle é exercido principalmente por mecanismos pós-transcricionais que atuam no metabolismo dos mRNAs e proteínas. Nesse contexto, as proteínas de ligação ao RNA (RBPs – RNA *Binding Proteins*) são componentes essenciais uma vez que interagem com os mRNAs e coordenam seus destinos na célula. Dentre as diferentes famílias de proteínas que compõem o repertório de RBPs do *T. cruzi*, estão as que apresentam o domínio dedo de zinco C3H. As proteínas TcZC3H39 e ZFP29 possuem esse domínio e foram objetos de estudos anteriores de nosso grupo, os quais avaliaram a expressão e localização celular no ciclo de vida do parasita, bem como os transcritos alvos associados a elas. Uma estratégia que permite avaliar um fenótipo associado a um gene específico é a utilização de abordagens de genética reversa como o nocaute gênico. Recentemente, foi descrito o sistema de nocaute CRISPR/Cas9 como um método alternativo de genética reversa, que está sendo aplicado em diversos organismos, incluindo no *T. cruzi*. Sendo assim, como forma de avaliar o papel das proteínas TcZC3H39 e ZFP29 no metabolismo de RNA do *T. cruzi*, utilizou-se o sistema CRISPR/Cas9 para nocautear os seus respectivos genes e avaliar os fenótipos correspondentes. Inicialmente, foi proposta uma melhoria nas estratégias atuais utilizadas para nocaute gênico via sistema CRISPR/Cas9 no *T. cruzi*. A estratégia proposta consiste em combinar as vantagens dos dois métodos já descritos e solucionar as suas desvantagens. Nós validamos a metodologia através da realização do nocaute dos genes que codificam para as proteínas GP72 e α -Tubulina, utilizados como controles devido ao nocaute desses genes resultar em fenótipos conhecidos. Após o estabelecimento do protocolo experimental, partiu-se para o nocaute de TcZC3H39 e ZFP29. Como resultado, foram observadas grandes alterações na morfologia e no ciclo celular dos parasitas. Ainda, houve o comprometimento da viabilidade celular, o que sugere que as proteínas TcZC3H39 e ZFP29 são essenciais para a sobrevivência do parasita e podem desempenhar importantes papéis na sua biologia.



22. CHARACTERIZATION OF *Trypanosoma cruzi* TRANSLATION INITIATION FACTORS IF4E AND SPECIFIC INTERACTIONS WITH THE TCIF4G5 ISOFORM

Bruno Moisés de Matos^{1 3}, Brenda C. M. Ribeiro³, Jimena F. Costa^{2 3}, Fabíola B. Holetz³, Nilson I.T. Zanchin^{2 3}, Beatriz G. Guimarães^{1 3}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná

² Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná

³ Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ/PR

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi* protozoan, belongs to the group of so-called neglected tropical diseases. There is currently no approved vaccine against this disease and the available chemotherapy is associated with several problems as high cost, length of the treatment and unpleasant side effects. Thus, more than a century after its first description, Chagas disease still remains a public health problem in Latin America. Identification and validation of molecular targets for the development of novel compounds have focused on the molecular mechanisms that are unique to Trypanosomatids as compared to other eukaryotes. In particular, Trypanosomatids present key differences in protein synthesis machinery composition and interaction pattern. The first major difference involves the 5' structure of the mRNAs. While in mammalian cells, mRNAs contain cap-0, Trypanosomatids mRNA contain cap-4, which in addition to the methyl-7-GTP of cap-0, is methylated on the first four nucleotides of the spliced leader RNA. Moreover, Trypanosomatids possess up to six orthologs for IF4E, suggesting that this complex cap-4 structure may have implications on the interaction mode of the IF4E isoforms with the mRNA. Protein-protein interactions of the transient translation initiation complexes also reveals some unique features in Trypanosomatids. For instance, the *Leishmania* IF4E4 isoform interacts with the polyadenylate-binding protein 1 (PABP1) and with IF4G3 while IF4E3 binds to IF4G4. Our results from yeast two-hybrid assays showed that in *T. cruzi* IF4E3 interacts with PABP1. In addition, a novel interaction involving IF4E5 and IF4G5 was identified in *T. cruzi*. Our project aims to perform the structural characterization of *T. cruzi* initiation factors IF4E and to evaluate their interactions with the mRNA cap-4 and IF4G isoforms. The characterization of specific binding pairs that are not found in the mammalian host cells can be exploited to design inhibitors against the parasite. *T. cruzi* IF4E1, E2, E5 and E6 were overexpressed in *E. coli* and purified by chromatographic methods. We have also produced variants of *T. cruzi* IF4G5, containing truncations in the N-terminal region, where the 4E-binding motif is commonly found. The purified proteins were analyzed by circular dichroism and submitted to crystallization. Size exclusion chromatography analysis suggested direct interaction between TcIF4G5 and IF4E5, confirming the results obtained by yeast two-hybrid method. We have also performed *in silico* analysis aiming to investigate the potential differences in the IF4G and cap binding sites among *T. cruzi* IF4E isoforms. Homology modeling methods were applied and



comparison with available structures of human eIF4E revealed interesting amino-acids substitutions and insertions that can play a role in the interaction mechanism of TcIF4E isoforms with the mRNA cap-4. Our future goals include to analyze the interaction of TcIF4E5 with short peptides derived from TcIF4G5 to determine the specific motif responsible for the interaction. We will also perform quantitative assays in order to determine the association constants of TcIF4E isoforms and mRNA cap analogues.



23. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS SEIS HOMÓLOGOS DO FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO EIF4E DE *Trypanosoma cruzi*

Camila Sayuri Tominaga da Cunha¹, Jimena Ferreira da Costa², Eloise Guerra Slompo, Bruno Dallagiovanna¹, Fabíola Barbieri Holetz¹.

¹ Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ – Curitiba, Paraná, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFPR, Paraná, Brasil

E-mail: biaholez@gmail.com

Nos tripanosomatídeos diferentes linhas de evidências indicam que a regulação da expressão gênica ocorre majoritariamente por mecanismos pós-transcricionais, sendo a biossíntese de proteínas, ou tradução, considerada uma etapa crítica para esta regulação. A etapa de iniciação da tradução é, sem dúvida, a mais complexa dentre todo o processo e a mais sujeita a mecanismos de regulação. Dentre as proteínas envolvidas no início da tradução, destaca-se o complexo eIF4F, formado pelas proteínas eIF4A, eIF4E e eIF4G. eIF4E parece ser o fator de início limitante e alvo de regulação na maioria dos eucariotos estudados e desta forma, presume-se que a formação de eIF4F é, em grande parte, regulada pela disponibilidade de eIF4E. Em tripanosomatídeos foi observada a ocorrência de múltiplos homólogos para as subunidades eIF4E e eIF4G, entretanto, esta multiplicidade de homólogos não é observada em outros eucariotos unicelulares, como por exemplo em leveduras. Embora existam estudos a cerca destes múltiplos homólogos em *T. brucei* e *Leishmania*, até o momento nenhuma função específica para cada homólogo foi caracterizada, nem tampouco, foi descrito se há redundância em suas funções. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é a caracterização molecular dos seis homólogos do fator de início de tradução eIF4E (eIF4E1-6) de *T. cruzi*. Para isto, foram produzidos anticorpos policlonais específicos para cada um dos homólogos de TcelF4E. Por ensaios de *western blotting* foi visto que todos os homólogos são regulados durante a metaciclogênese e resultados preliminares dos gradientes de sacarose de parasitos selvagens tratados com ciclohexamida e puromicina, demonstram um possível envolvimento desses homólogos no início da tradução e em sua regulação. Ensaios de imunofluorescência indireta estão em andamento para analisar a localização dos fatores e confirmar a expressão dos homólogos durante a metaciclogênese. Estes resultados obtidos, junto a identificação de possíveis parceiros funcionais dessas proteínas podem ajudar a definir se estes fatores estão associados a mecanismos únicos dos tripanosomatídeos, não encontrados nos demais eucariotos, que possam no futuro contribuir para a produção de quimioterápicos, capazes de inibir especificamente a síntese proteica destes parasitas.



24. ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE ABCA7 COM A IDADE DE INÍCIO E AVALIAÇÃO COGNITIVA EM PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER.

Carla Daniela Sulzbach¹, Meire Silva Batistela¹, Nalini Drieli Josviak¹, Daiane Priscila Simão-Silva², Ricardo Krause Martinez de Souza³, Mauro Roberto Piovezan⁴, Lupe Furtado-Alle¹, Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza¹.

¹ Universidade federal do Paraná

² Pontifícia Universidade Católica do Paraná

³ Instituto de Neurologia de Curitiba

⁴ Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

E-mail: carlasulzbach@gmail.com

A doença de Alzheimer (DA) é uma das doenças mais frequentes ligadas ao avanço da idade, devido à prevalência aumentada da expectativa de vida da população mundial. Por ser uma doença multifatorial, o seu desenvolvimento e progresso não estão bem esclarecidos, assim, pesquisas para um melhor entendimento são necessárias. O que é conhecido sobre a DA, são as características neuropatológicas da doença, que incluem a formação de placas amilóides, emaranhados neurofibrilares e atrofia hipocampal e de córtex cerebral. Porém, para o surgimento e a evolução destas características existem hipóteses relacionadas a vias de desenvolvimento, que incluem o metabolismo de colesterol. As proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*) em humanos são divididas em 7 subfamílias, contendo 48 genes distintos. Nosso objetivo foi analisar a associação de 2 polimorfismos do gene *ABCA7* responsáveis pela produção de proteínas ABC transportadora, por meio de um estudo caso-controle. O gene *ABCA7* é vinculado com o transporte de substratos, como o colesterol. Foram investigados dois SNPs (*single nucleotide polymorphism*) do gene *ABCA7* (rs2279796 e rs3764650) em pacientes com DA esporádica e um grupo de idosos cognitivamente saudáveis. O rs2279796 foi genotipado utilizando o ensaio de discriminação alélica TaqMan em sistemas de PCR em tempo real StepOnePlus™, enquanto que o rs3764650 por PCR-RFLP. Não houve diferença na frequência alélica entre os grupos de pacientes e controles ($p=0,4962$), nem na frequência genotípica ($p=0,2390$) para rs2279796. Um resultado semelhante foi encontrado em comparações entre grupos de pacientes e controle para rs3764650 nas frequências alélicas e genotípicas ($p = 0,7691$ e $p = 0,5474$, respectivamente). Avaliação cognitiva dos pacientes com DA foi verificada a partir do mini exame de estado mental (MEEM), por não ter uma distribuição normal verificamos o valor da mediana (15 pontos) e dividimos em grupos abaixo e acima da mediana. A partir disto, com o rs3764650, foram comparadas as frequências genotípicas e foram encontrados valores significativos para o modelo codominante ($p = 0,0124$), alélicas ($p = 0,08609$) e para o modelo sobredominância ($p=0,0070$), associado a cognição mais deficiente. Outro resultado significativo por



comparações de frequências do rs3764650 foi considerando a idade de início da DA, que foi dividida em grupos abaixo e acima da mediana (74 anos). O resultado mostra um valor significativo na comparação das frequências alélicas ($p = 0,04214$), mas não houve diferença nas frequências genotípicas. Essa diferença na frequência alélica foi confirmada na regressão múltipla ($p = 0,049$), mostrando o alelo G com maior frequência nos indivíduos que desenvolvem a DA antes dos 74 anos. A informação de fazer ou não o tratamento para controle dos níveis de colesterol foi colocada como variável dependente na regressão múltipla e o rs2279796, utilizando o modelo dominante (A/A + A/G – $p = 0,0039$) mostrou-se uma variável independente com efeito significativo sobre a amostragem que faz tratamento para colesterol. Essa informação só foi verificada na regressão e não nas comparações de frequências. Estes resultados corroboram os achados já descritos na literatura, os quais descrevem resultados relacionados ao metabolismo de colesterol, resposta imune e funções sinápticas. A expressão do *ABCA7* pode ser regulada por proteínas de ligação ao elemento regulatório de esterol, justificando o envolvimento da proteína Abca7 com o efluxo de colesterol.

Fonte Financiadora: CAPES



25. PLATAFORMA BASEADA EM HPLC PARA DETERMINAÇÃO DE TOXINAS URÊMICAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Carla Juliana Ribeiro Dolenga, Lia Sumie Nakao.

Laboratório de Neurobiologia e Patologia Redox, Universidade Federal do Paraná

E-mail: carla.vet10@gmail.com

Introdução. Sulfato de Indoxil (IS), Sulfato de *p*-Cresil (pCS) e Ácido 3-Indol Acético (IAA) são toxinas urêmicas de baixo peso molecular que se ligam a proteínas e são constantemente produzidas pelo nosso organismo e em condições fisiológicas são eliminadas pelos rins. Pacientes da doença renal crônica (DRC) retêm essas toxinas que se acumulam no sangue induzindo a uma diversidade de respostas celulares. A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) é um método capaz de quantificar essas toxinas em diferentes amostras biológicas, por isso padronizamos o processamento, a detecção e a quantificação das três toxinas em células, soro e plasma. **Método.** Padronizamos um método cromatográfico para cada tipo de amostra. Adaptamos os métodos de Miyamoto (2011) para analisar IS, pCS e IAA das células, e de Calaf (2011) para analisar as mesmas toxinas em soro/plasma. As toxinas urêmicas foram separadas em coluna cromatográfica C8. Os métodos utilizaram detector de fluorescência e fases móveis compostas por Metanol e Formiato de Amônio 50mM. A padronização da incorporação das toxinas em células foi realizada utilizando células mesangiais humanas, e para soro/plasma foram utilizadas amostras de voluntários saudáveis e pacientes com doença renal crônica. **Resultados e Discussão.** Verificamos que ocorre uma incorporação das toxinas urêmicas nas células tratadas durante 4 horas com padrões comerciais em concentrações encontradas em pacientes com doença renal crônica, na presença de meio de cultivo acrescido de 4% BSA. Para soro/plasma validamos a metodologia com base na Resolução 27/2012 (ANVISA), para identificação e quantificação das toxinas totais encontradas nessas amostras. **Conclusão.** Foi possível padronizar um método cromatográfico para quantificar a incorporação das 3 toxinas urêmicas simultaneamente em células e amostras de soro/plasma. Futuramente, faremos a validação do método para quantificação das toxinas livres em soro/plasma.



26. IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NUCLEOTIDE SUGAR TRANSPORTERS IN *Trypanosoma cruzi*

Carlos Gustavo Baptista¹, Elizabeth Cristina Rodrigues², Patricia Alves Morking³, Amanda Klinke³, Maria Luisa Zardo³, Maurilio Jose Soares³, Alessandra Melo de Aguiar³, Samuel Goldenberg³ and Augusto S P Ramos³.

¹Dep. Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

² Dep. Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

³ Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Paraná, Curitiba, PR, Brazil

E-mail: aspramos@fiocruz.br

Introduction: Glycoconjugates are essential for survival and infectivity of parasites. Their synthesis occurs in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus using nucleotide sugars as substrates. These molecules, however, are mostly synthesized in the cytosol and must therefore be transported across the ER and Golgi membranes. This intracellular transport of nucleotide sugars is essential for glycosylation and it is carried out by nucleotide-sugar transporters (NSTs). In this study we have identified and partially characterized three transporters from *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. TcNST1 transports UDP-N acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), TcNST2 transports UDP-galactose (UDP-Gal) and TcNST3 transports GDP-mannose (GDP-Man). Materials and methods: Complementation assays in yeast (*Kluyveromes lactis*) and mammalian cells (CHO) were analyzed by flow cytometry. In *Saccharomyces cerevisiae*, complementation was based on a test growth in the presence of Congo red. Sub cellular localization studies using GFP fusion proteins were performed by fluorescence microscopy. Gene expression was analyzed by RT-PCR. Knockout *T. cruzi* mutants were obtained by gene disruption using an integrative cassette. Infection assays were performed in VERO mammalian cells. Metacyclogenesis, a process by which epimastigote forms differentiate into infective metacyclic trypomastigotes, was carried out under nutritional stress using chemically defined axenic conditions. Results and Discussion: We have identified a family of 11 putative NSTs. Heterologous expression of these genes in a *K. lactis* mutant strain revealed only one UDP-GlcNAc transporter (TcNST1). TcNST2 and TcNST3 were identified by complementation of CHO and *S. cerevisiae* mutant cells, respectively. TcNST1 and TcNST2 are localized to the Golgi apparatus and the three transporters seem to be expressed in all stages of the parasite life cycle. Knockout experiments indicate that *TcNST1* is an essential gene. Single knockout (sKO) mutants are partially impaired in cellular differentiation and infectivity. Furthermore, infective *T. cruzi* metacyclics are resistant to complement-mediated lysis while sKO mutants are susceptible, which suggests that the single mutants display an altered membrane



surface. In accordance with this hypothesis, western blotting analysis showed a reduction in low molecular weight mucins in the mutant. Importantly all these mutant phenotypes were partially restored when the wild type gene was reintroduced into the mutants. Conclusions: The *TcNST1* gene, which codes for a UDP-GlcNA transporter, is an essential gene. The fact that even single knockout mutants, which retain one wild type allele, display a number of phenotypes reveal the critical role of NSTs in this parasite.

Acknowledgements: Fiocruz, CNPq and Fundação Araucária



27. SINVASTATINA TEM AÇÃO CITOTÓXICA E SUPERA A RESISTÊNCIA MEDIADA PELO PROCESSO AUTOFÁGICO EM CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO

Carolina Simões Pires Ribeiro, Rafaela Pino Gomes, Otávio Martins Cruz, Gláucia Regina Martinez, Sheila Maria Brochado Winnischofer.

Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica

E-mail: carolinaspribeiro@gmail.com

O melanoma é um tipo de câncer de pele que possui baixa incidência, porém é muito agressivo e com alto índice de mortalidade. Um dos grandes desafios da terapêutica atual é a ocorrência de processos de resistência. A capacidade de resistência tumoral é bastante complexa e, em geral, ocorre devido as células tumorais sofrerem mutações, amplificações ou superexpressões de genes regulatórios, além da modulação de mecanismos compensatórios (como senescência e autofagia) que promovem a resistência. A condição de resistência propicia aumento da tolerância das células tumorais aos efeitos citotóxicos de fármacos e/ou ativa sinais de sobrevivência nas mesmas. Esses fatos reforçam a necessidade da busca por diferentes terapias mais eficientes que superem os mecanismos de resistência tumoral. A sinvastatina é um fármaco da classe das estatinas utilizado no tratamento de dislipidemias. Atualmente, sabe-se que possui ação antitumoral, sendo capaz de induzir apoptose, parada do ciclo celular e modular o processo de autofagia em diversas linhagens de tumores. A relação entre autofagia e apoptose é controversa, pois, a autofagia ora é tratada como mecanismo capaz de suprimir o desenvolvimento do tumor, ora capaz de promover o tumor fornecendo substratos da degradação de componentes celulares. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar se a sinvastatina é capaz de modular o processo autofágico em células de melanoma metastático humano da linhagem WM9. Nossos resultados mostram que a sinvastatina foi capaz de reduzir a porcentagem de células metabolicamente ativas de forma dependente da concentração, atingindo 53,5 % e 90,3 % de redução após tratamento das células com sinvastatina nas concentrações de 1 μM e 5 μM , respectivamente, por 72h. O efeito citotóxico foi acompanhado do aumento da quantidade de células na fase G0-G1 do ciclo celular, assim como aumento da porcentagem de células com DNA fragmentado (10,05% na maior concentração). Para melhor compreender o mecanismo de ação da sinvastatina, foram avaliados dois marcadores importantes do processo autofágico: LC3-I/II e p62. Pode-se observar que células WM9 tratadas com sinvastatina apresentam aumento da expressão de LC3-I/II e concomitante redução dos níveis de proteína p62 de forma dependente da concentração de sinvastatina utilizada. Ainda, foi observado que o número de células WM9 com vacúolos fluorescentes (marcados com a proteína de fusão GFP-LC3) aumentam percentualmente com o aumento da concentração de sinvastatina utilizada nos tratamentos, fato que corrobora os resultados de expressão. O co-tratamento de sinvastatina com o inibidor autofágico hidroxicloroquina promoveu inibição efetiva do processo autofágico, com concomitante aumento da sensibilidade



das células WM9 aos efeitos citotóxicos da sinvastatina, o que reduziu de forma mais expressiva a porcentagem de células metabolicamente ativas (97% na condição de tratamento sinvastatina/hidroxicloroquina, 5 μ M/25 μ M), acompanhada de aumento da quantidade de células com DNA fragmentado (18,4% também nessa combinação). Quando o processo autofágico foi inibido pelo uso da hidroxicloroquina, observou-se que a expressão de LC3-I/II foi reduzida e os níveis de p62 não foram alterados. Juntos, nossos dados sugerem que o tratamento das células WM9 com sinvastatina foi capaz de induzir o processo autofágico de maneira concentração-dependente, sendo este um mecanismo de resistência tumoral em modelo de melanoma humano. Vale destacar que, independente do aumento no fluxo autofágico, a sinvastatina ainda assim foi citotóxica, o que torna interessante a possibilidade de ser utilizada como um agente terapêutico alternativo e/ou adjuvante ao uso de quimioterápicos padrões.



28. DELEÇÃO DA HISTONA DESACETILASE 2 (TgHDAC-2) AFETA A INVASÃO E A REPLICAÇÃO DE *Toxoplasma gondii*.

Caroline de Moraes de Siqueira; Mariana Sayuri Ishikawa Fragoso, Priscila Hiraiwa, Vanessa Rossini Severo, Andréa Rodrigues Ávila, Sheila Cristina Nardelli

Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, PR, Brasil

E-mail: carol.moraes.siqueira@gmail.com

A desacetilação de histonas é uma forma de regulação epigenética que está associada ao silenciamento gênico, uma vez que a remoção de grupos acetil por histona desacetilases (HDACs) resultam em uma cromatina mais condensada. Em *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) pouco se sabe sobre estas enzimas, mas acredita-se que elas são uma parte essencial da regulação da expressão gênica. *T. gondii* possui 7 HDACs, incluindo HDAC-2 (TgHDAC-2), o objeto do nosso estudo. Embora seja considerada uma HDAC clássica de classe I, muito semelhante a outros eucariotos, a TgHDAC-2 possui duas inserções aminoacídicas dentro do domínio HDAC característico, algo exclusivo de alguns membros do filo Apicomplexa, e cuja função permanece desconhecida. Além disso, resultados de RNA-seq depositados na base de dados de *T. gondii* mostram um aumento da expressão de TgHDAC-2 durante a fase S do ciclo celular. Para caracterizá-la, obtivemos o nocaute de *tghdac-2*, o qual foi substituído pelo gene *hxgprt* através de recombinação homóloga. Até o momento, observamos menor infectividade e taxa de proliferação de parasitas $\Delta tghdac-2$, sugerindo um papel durante a progressão do ciclo celular, possivelmente durante a fase S. Também notamos que os parasitas $\Delta tghdac-2$ se apresentavam desorganizados no vacúolo parasitóforo, possivelmente devido a defeitos no ciclo celular. Para confirmar estas hipóteses, foi feita uma análise de ciclo celular por citometria de fluxo, onde observamos enriquecimento de parasitas nocaute na fase S do ciclo celular, evidenciando algum defeito ou atraso nesta fase. Com o objetivo de analisar o nível de acetilação de histonas conservadas nos parasitas $\Delta tghdac-2$, foram feitos ensaios de Western blot para histonas H3 e H4 acetiladas, porém não mostraram diferenças estatísticas nos níveis de acetilação na ausência de TgHDAC-2, indicando que ela não é responsável por desacetilar estas histonas. Contudo, não podemos descartar que a TgHDAC-2 possa ter outras histonas como alvo ou ainda outros substratos. Além disso, iremos analisar estruturalmente a proteína por difração de raios-X, a fim de desvendar a estrutura secundária das inserções aminoacídicas presentes no domínio HDAC, pois até o momento não há estrutura conhecida nos bancos de dados. A localização celular desta proteína também será avaliada, após produção de anticorpos policlonais ou etiquetamento da proteína endógena, que poderão ser utilizados para realizar imunoprecipitações, onde serão identificadas as proteínas parceiras de HDAC-2. Estes dados em conjunto fornecem indícios sobre a função de HDAC-2 em *T. gondii*, indicando que esta proteína pode estar envolvida, principalmente, em processos celulares importantes, como a replicação.

Agências financiadoras: CAPES, CNPq, Fundação Araucária, ICC/Fiocruz-PR



29. PROSPECÇÃO PROTEÔMICA DE BIOMARCADORES ERITROCITÁRIOS ASSOCIADOS AO DIABETES MELLITUS TIPO 2

Catiane Pompilio Brescansin, Liliane de Paula Silva, Danielly Roesler, Bruna Rodrigues Martins, Fabiane Gomes de Moraes Rego, Geraldo Picheth, Dayane Alberton

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

E-mail: dayanealberton@ufpr.br

O *Diabetes mellitus* (DM) é caracterizado por um quadro hiperglicêmico decorrente da deficiência na síntese, na ação da insulina, ou ambos. O diagnóstico precoce do diabetes, atrelado ao adequado tratamento e monitoramento, permite minimizar e postergar o aparecimento das complicações associadas (nefropatia, retinopatia, doença cardiovascular, entre outras), melhorando a qualidade de vida dos afetados e reduzindo os custos do sistema de saúde pública. Atualmente, os critérios diagnósticos para o diabetes ainda são baseados na glicemia em jejum, teste oral de tolerância a glicose ou dosagem de hemoglobina glicada. Considerando a complexidade e as complicações da doença e o diagnóstico realizado através da dosagem de glicose em diferentes condições ou da dosagem de hemoglobina glicada, é de extrema importância que novos biomarcadores confiáveis para o diagnóstico, tratamento e prognóstico da patologia sejam pesquisados. **Objetivo:** comparar através de análise proteômica, o perfil proteico da membrana e do citoplasma de eritrócitos de pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2), com mau e bom controle glicêmico e indivíduos sem diabetes. **Metodologia:** O projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná sob o número CAAE: 01038112.0.0000.0102. As proteínas dos eritrócitos, tanto de membrana quanto do citosol foram extraídas, separadas por eletroforese SDS-PAGE 12%, analisadas por densitometria e identificadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. **Resultados:** 11 bandas proteicas foram visualizadas no gel de poliacrilamida, sendo que, 4 bandas apresentaram diferenças no valor de volume relativo e essas bandas foram identificadas como proteína 4.1, gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (G3PDH), banda 3 ou mistura de proteína 4.1 e banda 3 ou mistura de G3PDH e banda 3. No grupo DM2 com mau e bom controle glicêmico, os volumes relativos da enzima G3PDH ($66\% \pm 23$ e $56\% \pm 18$, respectivamente) não apresentaram diferença com significância estatística ($P < 0,05$), apenas quando comparados com o volume do grupo controle ($21\% \pm 10$). Para as bandas que foram identificadas como proteína 4.1 não houve diferença com significância estatística ($P < 0,05$) entre os grupos em estudo. **Conclusão:** De acordo com a literatura, a enzima citosólica G3PDH, em condição de estresse oxidativo, associa-se ao domínio citosólico da proteína integral de membrana, a banda 3. Portanto, é possível inferir que, os elevados volumes das bandas de G3PDH, oriunda da membrana dos eritrócitos de pacientes DM2 com mau e bom controle glicêmico em relação ao grupo controle, poderiam ser indicadores de estresse oxidativo nos eritrócitos desses pacientes.



30. IDENTIFICAÇÃO DE MIRNAS ASSOCIADOS A POLISSOMOS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS

Daiana Leila Drehmer, Bruno Dallagiovanna Muñiz

Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, PR, Brasil

E-mail: dldrehmer@gmail.com

Introdução: Doenças cardiovasculares são a maior causa de morte no mundo todo e o tratamento atual é limitado e ineficaz em uma série de casos. A busca por novas terapias que possibilitem o reparo do tecido cardíaco segue ao lado da elucidação dos mecanismos de diferenciação, sobrevivência ou regeneração de cardiomiócitos, e células-tronco embrionárias (CTEs) são ferramentas muito úteis para o estudo desses mecanismos. Sabendo que os níveis de RNA mensageiro (mRNA) não necessariamente correspondem aos níveis proteicos, vários esforços têm sido feitos para entender a regulação pós-transcricional de mRNAs. microRNAs, pequenos RNAs não codificantes, são descritos como importantes reguladores nesta etapa, porém ainda pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação e função. Desse modo, o presente trabalho tem como objetivo identificar miRNAs associados a polissomos que estão diferencialmente expressos ao longo da diferenciação cardiomiogênica de CTEs. **Metodologia:** CTEs foram cultivadas e submetidas à diferenciação cardiomiogênica. O perfil polissomal das células em diferentes tempos da diferenciação foi avaliado, bem como a expressão dos miRNAs-302, -371a, -133a e -503, em CTEs e progenitores cardíacos. A associação a polissomos destes miRNAs foi analisada por qRT-PCR, usando diferentes inibidores da tradução. **Resultados e discussão:** Resultados preliminares mostram que pode estar ocorrendo uma redução na porção de ribossomos traducionalmente ativos ao longo da diferenciação. Também se observa que miRNAs exibem diferentes graus de associação a polissomos, sendo que os miRNAs -302, -371a e -133a parecem estar mais presentes na fração livre. miR-503 foi o único que mostrou uma associação mais forte a polissomos, sugerindo que este miRNA possa estar agindo regulando a tradução de seus RNAs alvo. **Conclusão:** Foi possível isolar e identificar miRNAs associados à fração polissomal de RNAs. Mediante o tratamento com diferentes inibidores da tradução conseguimos determinar o grau de associação dos miRNAs a polissomos. Perspectivas para o trabalho incluem o sequenciamento de miRNAs associados a polissomos em progenitores mesodermiais, progenitores cardíacos e cardiomiócitos.



31. EVIDÊNCIAS DE ATIVIDADE DO RETROTRANSPONON VIPER EM *Trypanosoma cruzi*

Danila Syriani Veluza^{1 2}, Cyndia Mara Bezerra^{2 3}, Marco Aurélio Krieger^{2 3} e Adriana Ludwig^{2 3}.

¹ Curso de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR)

² Laboratório de Genômica Funcional, Instituto Carlos Chagas (ICC)

³ Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP)

E-mail: danilaveluza@gmail.com; adriludwig@gmail.com

A doença de Chagas é um problema social e econômico, principalmente na América Latina onde resulta em 7.000 mortes e perdas de bilhões de dólares anualmente. Causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, a doença é transmitida por meio dos insetos barbeiros. O *T. cruzi* corresponde a uma espécie geneticamente heterogênea sendo composta de várias linhagens e o estudo dessa variabilidade genética pode ajudar no entendimento dos mecanismos de atuação e evolução da doença. Neste contexto, nosso trabalho visa o estudo de uma importante fonte de variabilidade genética, os elementos de transposição (TEs). Os TEs são segmentos de DNA capazes de se mover dentro do genoma usando como intermediário uma molécula de DNA (transposons) ou de RNA (retrotransposons). Dentre os retrotransposons, os elementos DIRS são pouco estudados e são caracterizados pela presença de uma tirosina recombinase e de repetições terminais que, a princípio, participam do processo de transcrição reversa do elemento embora os detalhes desse mecanismo de transposição ainda seja desconhecido. Especificamente, nosso projeto tem como objetivo estudar e caracterizar o elemento VIPER em *T. cruzi*, um retrotransposon do grupo DIRS, analisando sua estrutura e funcionalidade. Em nossas análises iniciais, verificamos que o VIPER codifica três fases abertas de leitura (do inglês *Open Reading Frames* - ORFs): o produto da ORF 2 codifica uma tirosina recombinase, da ORF 3 uma proteína com os domínios transcriptase reversa e RNaseH, e a ORF 1 há indícios de que codifica uma proteína GAG-like. O elemento VIPER não possui repetições terminais assim como outros elementos do grupo DIRS podendo então apresentar diferenças no processo de transcrição reversa. Por meio de análises *in silico*, encontramos alguns indícios de atividade do elemento como a presença de ESTs (do inglês *Expressed Sequence Tags*) na linhagem CL Brener e de peptídeos da ORF 2 em dados de espectrometria de massas. Também identificamos aproximadamente 20 cópias potencialmente codificadoras de cada ORF no genoma da linhagem Dm28c formando pelo menos 5 cópias completas do elemento. Por meio de RT-PCR, também evidenciamos expressão de RNA das três ORFs nas formas epimastigotas do parasita. Para análise de expressão diferencial de VIPER, realizaremos PCR em tempo real em diferentes condições de cultivo e formas de vida do parasita. Com o objetivo de compreender como ocorre a transposição de VIPER, realizaremos uma análise de localização celular das três proteínas do elemento no



parasita. Para isso as três ORFs foram clonadas separadamente em vetores de expressão de *T. cruzi* pTcGW com etiqueta GFP e 6-His e estão sendo transfectados em *T. cruzi* para posterior análise de microscopia e ensaios de Western Blot. Ao contrário do que alguns autores concluíram a partir de análises no genoma de CL Brener de que VIPER seria um elemento inativo, identificamos evidências de sua atividade na linhagem Dm28c e pretendemos, ao final do projeto, confirmar nossa hipótese de que o elemento está ativo e entender os mecanismos de sua mobilização. Além disso, o VIPER pode fornecer informações importantes para o entendimento do surgimento e evolução dos TEs em geral e, principalmente, dos elementos do grupo DIRS que são pouco estudados e compreendidos.



32. POLISSACARÍDEOS DO *Capsicum annuum* (PIMENTÃO): ATIVIDADE ANTITUMORAL NO MODELO DE CARCINOMA SÓLIDO DE EHRlich EM CAMUNDONGOS

Eliana Rezende Adami¹, Claudia Rita Corso¹, Natália Mulinari Turin Oliveira¹, Rafaela Caroline Santa Clara¹, Geórgia do Nascimento Erdmann², Lucimara Mah Cordeiro Cortes², Alexandra Acco¹.

¹ Departamento de Farmacologia, UFPR - Universidade Federal do Paraná.

² Departamento de Bioquímica, UFPR - Universidade Federal do Paraná.

E-mail: elianaradami@yahoo.com.br

Introdução: Os polissacarídeos tem se destacado como promissores agentes antineoplásicos por atuarem no sistema imunológico e por apresentarem poucos efeitos colaterais. **Objetivo:** Investigar os possíveis efeitos antitumorais dos polissacarídeos do *Capsicum annuum* (PCA) (pimentão) no modelo de carcinoma sólido de Ehrlich em camundongos. **Metodologia:** Foram inoculadas células de Ehrlich no membro pélvico direito (2×10^6 células/animal, s.c.) em camundongos fêmeas (25-30 g, CEUA/UFPR 984). Os animais foram tratados por 21 dias com PCA nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg (v.o.), metotrexato (MTX) na dose de 2,5 mg/kg (i.p., controle positivo) ou veículo (água destilada) na dose de 1 ml/kg (v.o), usando grupos com 6 a 7 animais. No 22º dia os animais foram eutanasiados e material biológico foi coletado para análises. **Resultados e discussão:** O tratamento com PCA reduziu significativamente ($p < 0,05$) o tamanho do tumor nas doses de 50 mg/kg (28,97%), 100 mg/kg (40,8%) e 150 mg/kg (54,04%), bem como o MTX (85%), no último dia de experimento em relação aos animais veículo. Na análise hematológica somente a dose de 150 mg/kg induziu linfocitose (196,25%), similar ao MTX (228,84%). Além disso os animais não apresentaram diferença no ganho de massa em todas as doses testadas. Parâmetros de estresse oxidativo no fígado e no tumor, e o teste *in vitro* do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) demonstraram que o PCA não apresentou atividade antioxidante. No entanto, na análise dos parâmetros inflamatórios o PCA induziu diminuição da atividade de mieloperoxidase nas três doses testadas, enquanto N-acetilglucosaminidase e óxido nítrico não se alteraram. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni ($p \leq 0,05$). **Conclusão:** Nossos dados evidenciam que o tratamento com PCA apresenta atividade antitumoral, cujo mecanismo de ação independe do estresse oxidativo, estando possivelmente relacionado com mediadores inflamatórios. Outras vias de sinalização tumoral, como inibição de proliferação celular e da angiogênese, e/ou indução da apoptose, estão sendo investigadas para elucidar seus mecanismos de ação e embasar o possível uso dos PCA como terapia de câncer.

Apoio financeiro: CAPES e CNPq



33. ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE POLISSACARÍDEOS DO *Solanum bataceum* (TAMARILLO) EM MODELO DE CARCINOMA

Eliana Rezende Adami¹, Claudia Rita Corso¹, Natália Mulinari Turin Oliveira¹, Liziane Cristine Malaquias¹, Geórgia do Nascimento Erdmann², Lucimara Mah Cortes Cordeiro², Alexandra Acco¹.

¹ Departamento de Farmacologia, UFPR - Universidade Federal do Paraná.

² Departamento de Bioquímica, UFPR - Universidade Federal do Paraná.

E-mail: elianaradami@yahoo.com.br

Introdução: Os fármacos antineoplásicos disponíveis apresentam alta toxicidade e baixo índice terapêutico. Devido a isso, busca-se novos agentes anticancerígenos com menos efeitos colaterais. Dentre os compostos estudados destacam-se os polissacarídeos, por suas atividades sobre o sistema imune. **Objetivo:** Investigar os possíveis efeitos antitumorais dos polissacarídeos do *Solanum bataceum* (PSB) (Tamarillo) no modelo de carcinoma sólido de Ehrlich em camundongos. **Metodologia:** Foram inoculadas células de Ehrlich no membro pélvico direito (2×10^6 células/animal, s.c.) em camundongos fêmeas (25-30 g, CEUA/UFPR 984). Os animais foram tratados por 21 dias com PSB nas doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg (v.o.), metotrexato (MTX, 2,5 mg/kg, i.p. – controle positivo) ou veículo (água destilada, 1 ml/kg, v.o.), em grupos com 6 a 7 animais. No 22º dia os animais foram eutanasiados e foi coletado material biológico para análises. **Resultados e discussão:** O tratamento com PSB reduziu o volume do tumor a partir do 11º até o 21º dia, atingindo inibição de 28,43%, 56,23% e 81,51% no final do tratamento nas três doses testadas, respectivamente, enquanto o MTX apresentou uma redução de 97,10 % em relação aos animais veículo ($p < 0,05$) no último dia de experimento. Na análise do perfil hematológico a maior dose induziu linfocitose (273,41%) e trombocitopenia (80,88%). Além disso os animais não apresentaram diferença no ganho de massa em todos os tratamentos. Parâmetros de estresse oxidativo avaliados no fígado e no tumor, e o teste *in vitro* do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), demonstraram que o PSB não apresenta atividade antioxidante relevante. Na análise dos parâmetros inflamatórios o PCA reduziu a atividade da mieloperoxidase nas três doses testadas, enquanto a N-acetilglucosaminidase e o óxido nítrico não se alteraram. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni ($p \leq 0,05$). **Conclusão:** Nossos dados evidenciam que o tratamento com PCA apresentou atividade antitumoral, cujo mecanismo de ação ainda está sob investigação, mas possivelmente está relacionado com modulação de resposta inflamatória. A elucidação de seus mecanismos de ação pode colocar o PCA como um possível composto para a terapia do câncer.

Apoio financeiro: CAPES e CNPq



34. DESENVOLVIMENTO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES PARA DETECÇÃO E INIBIÇÃO DA OSTEOPONTINA

Elisa Franquetto Andrade^{1,2}, Nilson Ivo Tonin Zanchin^{1,2}

¹ Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ.

² Programa de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná.

E-mail: nizanchin@fiocruz.br

A osteopontina é uma glicoproteína fosforilada secretada, para a qual são atribuídas funções no controle da biomineralização, reabsorção óssea e no sistema imune, atuando no reparo tecidual. Entretanto, quando a osteopontina interage com moléculas receptoras da matriz extracelular, ela tem sido associada a processos patológicos como doenças autoimunes e progressão de tumores, estimulando fatores relacionados com a invasão tumoral. Como seu nível de expressão encontra-se aumentado em uma variedade de cânceres, a osteopontina pode servir como um biomarcador nestas condições, podendo ser também um alvo para terapia. Dentre as ferramentas bioquímicas que podem ser usadas tanto para detecção como para inibir a ação da osteopontina estão os anticorpos. Para aplicações biotecnológicas e biomédicas podem ser usados fragmentos de anticorpos contendo apenas a parte funcional, como é o caso da fração de ligação ao antígeno (Fab) e dos fragmentos de fração variável de cadeia única (scFv). O presente trabalho tem como objetivo a produção de três fragmentos de anticorpos recombinantes do tipo scFv (14-8, 14-9 e 14-10) e de dois fragmentos do tipo Fab (14-8 e 14-10) para detecção e inibição da osteopontina. Os genes sintéticos que codificam os fragmentos scFv e Fab foram obtidos e clonados em seus respectivos vetores de expressão, sendo para os fragmentos do tipo scFv utilizado o vetor pET22b, enquanto que para os fragmentos do tipo Fab, que exige a montagem de duas cadeias polipeptídicas independentes, para as cadeias leves foi utilizado o vetor pPICZαA e para as pesadas o vetor pPIC9K. Foram realizados testes de expressão dos fragmentos de anticorpos do tipo scFv e da proteína osteopontina em *Escherichia coli* com subsequente purificação. Os anticorpos do tipo scFv foram testados em ensaios de Western blot para determinar se têm a capacidade de reconhecer a osteopontina. Foi possível demonstrar que um dos fragmentos do tipo scFv consegue detectar a osteopontina. Serão ainda realizados testes em culturas de células para verificar se este fragmento consegue inibir sua ação. Os fragmentos do tipo Fab foram expressos em *Pichia pastoris*. Até o momento foi obtido o fragmento 14-10 em seu peso molecular esperado. A expressão do Fab 14-8 ainda está em andamento. Novos testes de expressão e purificação dos fragmentos do tipo Fab serão realizados, para posterior análise funcional, possibilitando uma comparação em relação ao scFv de qual obtém uma maior eficiência para ligação à osteopontina, apresentando um maior potencial biomarcador e terapêutico.

Apoio financeiro: CAPES, Fundação Araucária, CNPq.



35. ANÁLISE DE LINCRNAS IDENTIFICADOS EM REGIÕES ULTRACONSERVADAS TRANSCRITAS NO CÂNCER DE MAMA

Érika Pereira Zambalde, Daniela Fiori Gradia, Iglenir Cavalli, Enilze Ribeiro, Jaqueline Carvalho de Oliveira.

Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

E-mail: erikazambalde@gmail.com

O câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres, excluindo os tumores de pele não melanoma e compreende um grupo heterogêneo de doenças, resultando em prognósticos e respostas clínicas distintas. Atualmente, os tumores de mama são classificados em cinco grupos, de acordo com o padrão de expressão gênica, sendo eles: Luminal A, Luminal B, Basal e “normal-like” e HER2+. Apesar da classificação, ainda há uma dificuldade na sua utilização na prática clínica. Desta forma, a identificação e validação de novos marcadores moleculares é importante para o melhor prognóstico, assim como para o desenvolvimento de novos tratamentos mais específicos, principalmente nos grupos com poucas alternativas terapêuticas. No genoma humano, foram identificadas 481 regiões ultraconservadas e seus transcritos denominados T-UCR (*transcribed ultraconserved regions*). Muitos destes transcritos são caracterizados como RNAs longos não codificantes e alterações em seus perfis de expressão têm sido associados a doenças, incluindo alguns tipos de tumores, porém, pouco se sabe da influência dessas regiões no câncer de mama. Na busca por entender melhor o papel desses transcritos no desenvolvimento do câncer de mama, o nível de expressão das 481 T-UCRs foram analisadas através dos dados de sequenciamento global de RNA depositadas no banco TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), que contém resultados de perfil de expressão de mais de 2.000 amostras desse tipo tumoral. Através dessa análise foi verificado que a expressão diferencial de 303 (62,99%) das T-UCRs estão associadas com algum parâmetro envolvido no desenvolvimento do câncer de mama. Mais detalhadamente podemos afirmar que a expressão diferencial de 209 (43,45%) dessas regiões estão relacionadas com a classificação dos subtipos moleculares, 172 (35,76%) com a presença de receptor de estrógeno, 158 (32,85%) com receptor de progesterona, 80 (16,63%) com a presença de HER2, 60 (12,47%) com estadiamento, 176 (36,59%) com terapia e 46 (9,56%) com sobrevida. Dentre essas regiões, demos destaque para quatro regiões que são intergênicas e portanto também classificadas como RNAs não codificantes longos intergênicos (lincRNAs). Mais detalhadamente, verificamos um aumento da expressão de uc.84 nos subtipos Luminal A e B, as regiões uc.193 e uc.268 apresentam uma expressão aumentada no subtipo basal e a região uc.427 foi encontrada diminuída também no subtipo basal. Estes resultados sugerem o envolvimento de alguns destes transcritos na patogênese do carcinoma mamário. Além disso, a expressão diferencial das regiões intergênicas associadas a um subtipo demonstra o potencial dessas regiões como biomarcadores para o câncer de mama. Contudo, maiores estudos são necessários para confirmar o efeito biológico e entender os mecanismos de atuação dessas regiões no câncer de mama.



36. STRESS INDUCIBLE PROTEIN 1 (STI1) IS SECRETED INTO THE ECM BY THE ER-GOLGI PATHWAY IN ASTROCYTES *IN VITRO*

Azevedo, Evellyn Mayla; Cópola-Segovia, Valentín; Rigo, Fernanda; Kosloski, Juliano; Nakao, Lia Sumie; Zanata, Marques Silvio

Department of Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

Stress-inducible protein 1 (STI1) is a co-chaperone that binds to Heat Shock Proteins (Hsp) Hsp70 and Hsp90 forming a complex responsible for the correct folding of nascent proteins. Primarily discovered in cytoplasm, STI1 was also observed in nucleus, vesicles, Golgi apparatus and cell surface of yeasts, mammal cells, and plant cells. In addition to its cellular localization, in the central nervous system (CNS) it was already demonstrated that STI1 is secreted by astrocytes through an unconventional pathway, associated with extracellular vesicles probably derived from multivesicular corpuscles. When released into extracellular space, STI1 can promote axogenesis, confers neuroprotection, and induce differentiation and survival of glial and neuronal cells, among other functions, depending on its receptor. Primary astrocyte cultures were prepared from 1-2-day-old rat pups, and plated on T25 culture flasks in Dubelco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin, and maintained in an incubator at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. ECM extracts were prepared by decellularization, using warm PBS-0.5% Tritón X-100, supplemented with ammonium hydroxide (NH₄OH) 20mM and extracted with 8M urea buffer and analyzed by western blot. To further investigate STI1 secretion into ECM, astrocytes were treated with Brefeldin A (BFA) 10mg/ml or Tunicamycin 1mg/ml for 6 hours. Then, to identify possible linkers for STI1 in ECM, a protein interaction assay was carried out using purified Laminin, Fibronectin and Vitronectin. In the present work, we show for the first time that STI1 is present in the ECM compartment of astrocytes *in vitro*. Moreover, we also provide supporting evidence of ER-Golgi classical pathway involvement in STI1 secretion into the ECM, as BFA treatment was able to strongly reduce STI1 presence in ECM extracts. Finally, we also suggest laminin as a possible linker protein for STI1 attachment into ECM. As expected by the lack of signal peptide for ER-Golgi transportation, recently was described that STI1 is released to extracellular space by an independent-ER-Golgi-pathway, involving exosomes, assisting axogenesis, neuroprotection and survival of neuronal cells. Together with those previous results, here we propose that STI1 is released via the ER-Golgi independent pathway when its final destiny is to reach the extracellular space, and released by the classical pathway when is attached into the ECM.



37. CARACTERIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA E CONTROLE POR WESTERN BLOTTING

Evelyn Vieira¹, Patricia Midori Murobushi Ozawa¹, Débora de Sousa Lemos², Ingrid Larissa Melo de Souza³, Danielle Malheiros Ferreira², Silvio Marques Zanata³, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro¹.

¹ Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

² Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

³ Laboratório Neurobiologia, Departamento de Patologia Básica da universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

E-mail: evelynvieira1995@gmail.com

A intercomunicação celular é essencial para o bom funcionamento de um organismo multicelular, e esse processo pode ser mediado por diversos mecanismos como contato célula-célula, por transferência de moléculas secretadas, ou por transferência intercelular através de vesículas, que também podem ser chamadas de vesículas extracelulares (VEs). Dentre os subtipos de VEs, os exossomos têm se destacado por possuir participação em diversos processos biológicos, tanto em condições fisiológicas, como no processo de sinalização do sistema imune, quanto em condições patológicas, como no câncer. O conteúdo intracelular dessas vesículas inclui DNAs, proteínas, RNAs e miRNAs, que podem variar de acordo com as condições fisiológicas ou patológicas do indivíduo, bem como de acordo com os tipos de células das quais são originadas, abrindo a perspectiva de serem utilizadas como biomarcadores em condições patológicas. Os exossomos estão presentes em todos os líquidos corporais e são naturalmente secretados por todos os tipos celulares, o que os tornam extremamente atraentes como potenciais biomarcadores diagnósticos ou de prognóstico, uma vez que não é preciso utilizar métodos invasivos para a sua obtenção. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o conteúdo proteico das VEs isoladas utilizando kit comercial, através da metodologia de western blotting. Foram utilizados 3 anticorpos no total, sendo dois deles marcadores para exossomos (CD9 e CD63) e 1 marcador da proteína argonauta 2 (AGO2), aos quais os miRNAs circulantes estão complexados. As amostras utilizadas foram provenientes da extração de RNA total de pacientes e controles, onde há uma etapa em que se isola os RNAs das proteínas utilizando o reagente Trizol. Estes precipitados de proteínas foram armazenados a -80°C e posteriormente purificados utilizando metanol e clorofórmio, para a retirada do Trizol. A seguir, foram aplicadas em gel SDS-page e transferidas para a membrana de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado com leite desnatado em TBST, e a incubação dos anticorpos primários (1:1000) foram feitas overnight. O anticorpo secundário era marcado com *horseradish* peroxidase (HRP), incubado na diluição de 1:4000. A detecção foi realizada utilizando um reagente quimioluminescente



Super Signal West Pico (Thermo Scientific) de acordo com protocolo do fabricante e reveladas em papel filme hipersensível. As amostras utilizadas para marcação com CD9 e CD63 utilizaram condições não redutoras. Foi possível observar a marcação para o CD9 e CD63 em todas as amostras de exossomos, sendo que o AGO2 se mostrou ausente nessas amostras. O controle positivo para AGO2 foram amostras isoladas a partir do soro sem a utilização do kit para isolar exossomos. Sendo assim, concluímos que o kit utilizado é eficaz no isolamento de amostras enriquecidas em exossomos e que não há contaminação com proteína proveniente do soro total.



38. EFEITOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DE MEDULA ÓSSEA HUMANA NO TRATAMENTO DE ASMA EM CAMUNDONGOS BALB/C

Felipe Yukio Ishikawa Fragoso¹, Addeli Bez Batti Angulski², Alexandra Cristina Senegaglia¹, Lidiane Maria Boldrini Leite¹, Pedro Vicente Michelotto Jr.¹, Alejandro Correa Domingues², Paulo Roberto Slud Brofman¹

¹ Pontifícia Universidade Católica do Paraná

² Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR.

Introdução: A asma é uma das doenças crônicas mais comuns, que afeta crianças e adultos, acometendo cerca de 300 milhões de pessoas ao redor do mundo. A terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais (CTM) é considerada uma estratégia promissora no tratamento de várias doenças respiratórias que atualmente não possuem tratamento eficaz, e as vesículas extracelulares (VE), derivadas de CTM, aparecem como nova e potencial proposta terapêutica. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de VE derivadas de CTM isoladas de medula óssea humana, aplicadas pela via intratraqueal (IT) ou sistêmica (S), no tratamento de camundongos Balb/C em modelo de asma induzida por ovalbumina (OVA). **Metodologia:** Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (nº 34309914.0.0000.0020) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (nº 904), na Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Quarenta e três camundongos Balb/C machos foram divididos em quatro grupos: Controle (C, $n=11$), Asmático (AS, $n=11$), Asmático tratado com VE via intratraqueal (VE-IT, $n=10$) e Asmático tratado com VE via sistêmica (VE-S, $n=11$). Os grupos AS, VE-IT e VE-S foram imunizados com injeções intraperitoneais de OVA em 100 μ L de solução salina estéril nos dias 0,2,4,7,9 e 10, então receberam instilação IT de 20 μ g OVA em 20 μ L de salina estéril, nos dias 15, 18 e 21. O grupo C recebeu somente solução salina nestes procedimentos. No dia 22, os animais dos grupos C e AS, receberam via IT 20 μ L de solução salina. Os animais do grupo VE-IT foram tratados via IT com 15 μ g/animal de VE de CTM humana, enquanto o grupo VE-S recebeu o mesmo tratamento pela via endovenosa. No dia 29 os animais foram submetidos a eutanásia. Os pulmões foram removidos para análise histopatológica através das colorações hematoxilina e eosina, ácido periódico de Schiff e tricrômio de Masson. Foram realizadas análises semi-quantitativas em 30 bronquíolos por animal, utilizando um escore de 0 a 3 para a presença e intensidade da inflamação pulmonar. Para a análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguidos do teste de Dunn, considerando $p<0,05$ como significativo. **Resultados e Discussão:** Os animais do grupo AS, demonstraram inflamação pulmonar em comparação com os animais do grupo C em todas as características analisadas ($p<0,001$). Os animais do grupo VE-IT, quando comparados com o grupo AS, apresentaram melhora significativa para os critérios avaliados: presença e intensidade do infiltrado inflamatório, espessamento da camada muscular lisa, espessamento epitelial, produção de muco, contagem total de células do fluido do LBA e deposição de



colágeno, tal redução pode estar relacionada com as atividades anti-inflamatórias presentes nas VE de CTM. Os animais do grupo VE-S, quando comparados com o grupo AS, apresentaram melhora significativa apenas para o critério da contagem total de células do fluido do LBA. **Conclusão:** A ação das VE isoladas de CTM humana apresentou variação conforme a via de aplicação utilizada, sendo que as VE aplicadas por via intratraqueal tiveram ação mais efetiva que as aplicadas pela via sistêmica.



39. INFLUENCE OF INTERLEUKIN-10 rs1800872 (C.-592C>A) POLYMORPHISM ON HPV INFECTION AND OVER IL-10 CERVICAL LEVELS IN HPV INFECTED WOMEN

Fernanda Costa Brandão Berti¹, Ana Paula Lombardi Pereira², Kleber Paiva Trugilo², Guilherme Cesar Martellosi Cebinelli², Nadia Calvo Martins Okuyama², Érica Romão Pereira², Michelle Mota Sena², Rodolfo Sanches Ferreira², Lorena Flor da Rosa Santos Silva³, Marcell Alysson Batisti Lozovoy³, Andréa Name Colado Simão³, Maria Angelica Ehara Watanabe², Karen Brajão de Oliveira²

¹ Department of Genetics, Biological Sciences Center, Paraná Federal University, Curitiba, PR - Brazil.

² Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Londrina State University, Londrina, PR - Brazil.

³ Department of Clinical Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Londrina, PR - Brazil.

E-mail: nandabrandao@hotmail.com

Introduction: Human Papillomavirus (HPV) stands as an important sexually transmitted virus, involved in squamous intraepithelial lesion and cervical cancer development. Besides HPV, other factors influence these clinical outcomes, including Interleukin-10 (IL-10), an important anti-inflammatory cytokine that favors cervical immunosuppression. IL-10 expression and production may be influenced by HPV itself and by polymorphisms on *IL-10* gene promoter region, including the rs1800872 (c.-592C>A). Therefore, the present study aimed to evaluate the influence of c.-592C>A polymorphism on HPV infection and over cervical levels of IL-10 in HPV infected women. **Methods:** This case control study included 174 patients with detected HPV genome and 186 without HPV genome, classified as controls. Cervical epithelial scrapings were obtained to determine HPV DNA presence by polymerase chain reaction (PCR) and to assess IL-10 cervical levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Peripheral blood samples were obtained to determine *IL-10* polymorphism by PCR followed by restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP). **Results and Discussion:** HPV was more prevalent among allele A carriers ($p < 0.001$), confirmed by different models (e.g., codominant, dominant and recessive models, as well as separating both alleles). Additionally, binary logistic regression analysis including age, smoking status, knowledge about HPV, number of sexual partners during lifetime and marital status as confounders, showed a significant and independent association between allele A and HPV infection. Heterozygotes [OR=2.081 95%CI (1.222 – 3.544), $p=0.007$] and allele A homozygotes [OR=3.745 95%CI (1.695 – 8.271), $p=0.001$] for c.-592C>A polymorphism presented, approximately, 2 and 4 time's greater odds of presenting HPV when compared to CC patients, respectively. Such association was demonstrated for the first time, and future studies are required to confirm if IL-10 c.-592C > A polymorphism may be a plausible marker of HPV infection



susceptibility. Moreover, we investigated if this association between IL-10 c.-592C > A polymorphism and HPV infection was related to IL-10 produced levels. Analyzing HPV infected and non-infected women together, we observed that IL-10 cervical levels were not significantly associated to the referred polymorphism (CC = 3.89 ± 2.57 pg/mL; CA + AA = 4.76 ± 2.96 pg/mL, $p = 0.166$). However, when we evaluated the association between IL-10 c.-592C > A polymorphism and IL-10 levels in HPV infected patients, we observed that IL-10 cervical levels were higher among HPV infected patients carrying the polymorphic allele A (CC = 3.87 ± 2.16 pg/mL; CA + AA = 6.15 ± 3.07 pg/mL, $p = 0.039$) when compared to CC patients thus, demonstrating that both IL-10 c.-592C > A polymorphism and HPV are modulating IL-10 levels. And in order to investigate if such influence on IL-10 levels is independently associated with IL-10 c.-592C > A polymorphism or with HPV, binary logistic regression analyses were conducted and demonstrated that IL-10 cervical levels were not independently associated to CA+AA genotypes ($p=0.162$), neither to HPV's presence ($p=0.061$), thus suggesting that changes in IL-10 cervical levels are possibly a result of both HPV and allele A presence. Based on previous data, one plausible hypothesis is that in the presence of HPV, some HPV proteins (i.e. E6 and E7) bind to a transcription factor called Sp1, forming E6-Sp1 and E7-Sp1 complexes that may bind more easily to a Sp1 recognition sequence (i.e. which is present in IL-10 promoter region pretty near to -592 nt), when allele A is present at -592 nt site, explaining why HPV infected women carrying allele A showed increased IL-10 cervical levels. **Conclusion:** Taken together, IL-10 c.-592C>A polymorphism was independently associated with HPV infection and may influence on viral persistence through increased IL-10 cervical levels in HPV infected women.

Funding Source: Capes, PPSUS, Fundação Araucária.



40. POLYMORPHISMS IN THE TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 GENE INFLUENCE CERVICAL LESIONS DEVELOPMENT

Kleber Paiva Trugilo, Fernanda Costa Brandão Berti, Guilherme Cesar Martelossi Cebinelli, Érica Romão Pereira, Adriano Martin Felis Aranome, Nadia Calvo Martins Okuyama, Fernando Cezar dos Santos, Ana Paula Lombardi Pereira, Michelle Mota Sena, Rodolfo Sanches Ferreira, Gabriela Cristine Queiroz Maria, Maria Angelica Ehara Watanabe, Karen Brajão de Oliveira

Laboratory of Molecular Genetics and Immunology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina – PR, Brazil.

E-mail: klebertrugilo01@gmail.com

Introduction: Persistent Human Papillomavirus (HPV) infection presents a close association with high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) and cervical cancer development. However, HPV alone is not sufficient for malignant progression. Exogenous and endogenous factors may influence the risk of cervical lesions. Transforming Growth Factor β (TGFB), a cytokine that is known for regulation of cell growth, maturation, and differentiation, has an important role in carcinogenesis and is associated with the progression of HPV infection to HSIL and cervical cancer. **Objective:** To assess the association between genetic variability in transforming growth factor beta 1 (*TGFB1*) gene and cervical lesions susceptibility. **Material and methods:** Cervical swabs and blood samples were obtained from 355 outpatient women, along with socio-demographic and sexual behavioral data. The study population was stratified by absence (normal cytology, $n=252$) or presence ($n=103$) of cervical lesions, as tested by cervical cytology. Four single nucleotide polymorphisms (SNPs), c.-1638G>A, c.-1347C>T, c.29C>T, and c.74G>C, in the 5' region of *TGFB1* were genotyped using PCR-restriction fragment length polymorphism. Haplotypes were provided by PHASE software (version 2.1) and the linkage disequilibrium between SNPs was analyzed by HaploView software (version 4.2). **Results:** Each polymorphism had the minor allele frequency higher than 5.0% and the linkage disequilibrium were higher between SNPs c.-1347C>T and c.29C>T ($r_2=0.93$). From twelve provided haplotypes only four (GTCTG, GCTG, GTCA, and CCG) were more frequent than 5.0% (43.9%, 32.0%, 10.2%, and 5.1%, respectively). In a binary logistic regression analysis adjusted to age, tobacco status, monthly income and number of sexual partners during lifetime, GTCTG haplotype allele in homozygosity was associated with a lower susceptibility of cervical lesions development, with odds ratio and 95% confidence interval of 0.46 and 0.22-0.96 ($P=0.04$). **Discussion:** The GTCTG combination has been associated with low TGFB1 plasma level. Therefore, the protection against cervical lesions development afforded by the *TGFB1* GTCTG haplotype could be resulted of low TGFB1 level in cervical epithelium and, as consequence, a lower immunosuppressive microenvironment that would favor the infection resolution and hence, cervical lesion regression. **Conclusion:** Although further studies are necessary, the presented data demonstrate that GTCTG haplotype is significantly associated with protection against HPV-caused cervical lesions.

Funding Source: Capes, PPSUS, CNPq, Fundação Araucária



41. DESCOBERTA, ANÁLISES COMPUTACIONAIS E EXPRESSÃO DE SBRNAS EM *Drosophila melanogaster*

Francisco Ferreira Duarte Junior¹, Paulo Sérgio Alves Bueno², Quirino Alves de Lima Neto¹, Fabiana dos Santos Rando¹, José Renato Pattaro Júnior^{1 2}, Daniel Caligari¹, Anelise Cardoso Ramos¹, Flavio Augusto Vicente Seixas², Maria Aparecida Fernandez¹.

¹ Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil.

² Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil.

E-mail: aparecidafernandez@gmail.com

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são descritos como reguladores de diversos processos celulares. Dentro destes, estão os Y RNAs, descobertos em 1981, associados às proteínas Ro60 e La, formando complexos macromoleculares denominados ribonucleoproteínas (RNPs). Elas estão ligadas ao processamento, controle de qualidade e estabilidade do RNA, e também atuam em respostas celulares ao estresse em diversos organismos. Visto que os Y RNAs são uma classe de ncRNAs presente em vertebrados, alguns autores afirmam que os stem-bulge RNAs (sbRNAs), encontrados inicialmente em *Caenorhabditis elegans*, são estrutural e funcionalmente homólogos aos Y RNAs. Ambos estão relacionados à replicação do DNA cromossomal, atuando como fatores essenciais para o início da replicação em humanos e se mostram altamente conservados em vertebrados e nematoides. O primeiro representante dos sbRNAs em insetos foi recentemente descrito para *Bombyx mori*. A identificação de sbRNAs em *Drosophila melanogaster*, principal inseto modelo para estudos em genética e biologia molecular, pode propiciar várias descobertas sobre a fisiologia e função destes ncRNAs, além de servir como comparativo evolutivo para o gene descrito em *B. mori*. A busca por possíveis sbRNAs, no genoma de *D. melanogaster*, foi realizada utilizando o banco de dados NCBI e um trecho de sequência conservada (GTGGTGTTTAC) para todos os sbRNAs já descritos. As sequências resultantes foram submetidas à ferramenta mFold Web Server, para verificar suas estruturas secundárias. A partir da sequência escolhida, um conjunto de primers foi sintetizado, e para a síntese de cDNA utilizou-se RNA total extraído da linhagem celular Cnn21, derivada de embrião de *D. melanogaster*. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas e analisadas por meio do pacote de programas NAMD2 e VMD utilizando o campo de força Charmm C35b2/C36a2. As coordenadas espaciais dos RNAs foram imersas em uma caixa periódica contendo água TIP3, com as cargas do sistema neutralizadas por íons sódio. Os demais parâmetros da simulação foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido por Duarte Jr et al, (2015). As simulações foram realizadas em 20 nós com processadores Intel Xeon E5-2695v2 Ivy Bridge, 2,4GHZ (480 núcleos) do supercomputador SDumont no LNCC, Brasil. A análise computacional resultou em duas sequências com estrutura homóloga à descrita para sbRNAs. Os



genes foram denominados de *DmsbRNA 1* (85 pb) e *DmsbRNA 2* (89 pb). As estruturas secundárias obtidas através do mFold, apresentam os atributos essenciais para a caracterização de um sbRNA: Uma haste composta pela junção das extremidades 5' e 3', separada em haste superior e inferior. A haste inferior contém o domínio de ligação de uma proteína ortóloga à proteína Ro60 e a porção final da cauda poli-U. Na haste superior encontra-se o domínio mínimo, região pareada (GUG – CAC) necessária para que a molécula tenha atividade licenciadora da replicação do DNA. Uma estrutura em loop, responsável pela interação com diversas proteínas, contendo um trecho de sequência conservada para sbRNAs. A dinâmica molecular mostrou que as estruturas 3D dos *DmsbRNAs* estavam em equilíbrio termodinâmico a partir de 30 ns, porém, o *Dm2*, entrou em equilíbrio em tempo de simulação menor. De qualquer forma, ambos se mostraram muito mais estáveis do que os Y RNAs utilizados como referência. O raio de giro de todos os RNAs analisados se mostrou constante ao longo do tempo, o que indica que as estruturas mantiveram seu padrão de enovelamento. Estes resultados sugerem que a estrutura tridimensional proposta para os *DmsbRNAs* são estáveis e reforça a hipótese destes segmentos serem RNAs funcionais. Por meio dos resultados demonstrados acima, é possível dizer que os genes *DmsbRNA 1* e *2* são os primeiros relatos de moléculas equivalentes a sbRNAs, no genoma de *Drosophila melanogaster*.



42. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO LNCRNA NORAD EM TUMORES DE MAMA E SUA CORRELAÇÃO COM A INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA

Gabrielle Araujo Pedroso Pereira, Jaqueline Carvalho de Oliveira, Carolina Mathias, Enilze MSF Ribeiro, Iglenir João Cavalli, Daniela Fiori Gradia

Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR.

E-mail: gabriellearaujo.pereiras@gmail.com

Os cânceres compõem um grupo heterogêneo de doenças causadas pela transformação de células normais, que passam a se dividir sem controle, e eventualmente se agregam formando tumores com capacidade invasiva. Alterações na expressão gênica e instabilidade cromossômica são condições características de células cancerosas ou em processo de tumorigênese e, qualquer fator que contribua com esses fenômenos pode ser sugerido como potencial promotor tumoral. O NORAD é um RNA longo não codificante (lncRNA) relacionado a processos de regulação da expressão gênica, modulando a atividade das proteínas PUMILIO, que regulam processos importantes no ciclo e diferenciação celular. A inativação de NORAD em linhagens celulares normais, pode resultar em instabilidade cromossômica, sugerindo que modificações na via regulatória de PUMILIO e NORAD poderiam determinar alterações na expressão de genes responsáveis pela manutenção da integridade genômica. Desta forma, é provável que PUMILIO e NORAD estejam relacionados com o processo de transformação neoplásica. Assim, o objetivo do presente estudo é analisar os níveis de expressão do lncRNA NORAD em amostras de tumores mamários humanos com comprovada presença de instabilidade cromossômica. A partir de dados disponíveis nos bancos de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e *The Atlas of non-coding RNA in Cancer* (TANRIC) foi avaliada a expressão do lncRNA NORAD nos subtipos moleculares de câncer de mama, *Basal-like* (n=95), *Normal-like* (n=7), *HER2 enriched* (n=56), Luminal A (n=144) e Luminal B (n=123) em comparação com o tecido mamário normal (n=107). Para isto, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0,001$), seguido de uma comparação múltipla entre os grupos (teste de Tukey), utilizando o software *Statistica 13.0*. Observou-se uma redução estatisticamente significativa da expressão de NORAD dos subtipos *Basal-like* ($p < 0,01$), e *Her2 enriched* ($p < 0,05$) em comparação com o tecido normal adjacente. Paralelamente, uma análise inicial em cinco amostras de tumor de mama do tipo carcinoma ductal invasor, com resultados alterados de aCGH, indicou diminuição significativa de expressão de NORAD através de PCR. Estes dados preliminares apontam para a possível utilização da expressão do lncRNA NORAD como um marcador de instabilidade cromossômica auxiliando na conduta médica.



43. FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF *Trypanosoma brucei* RRP44 RIBONUCLEASE

Giovanna Cesaro^{1 2}, Flávia R. G. Carneiro², Andrea R. Ávila², Nilson I.T. Zanchin², Beatriz G. Guimarães^{1 2}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica, Universidade Federal do Paraná

² Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ/PR

Trypanosomatids are unicellular parasites, which causes a number of serious diseases in humans, such as the sleeping sickness and Chagas disease. These parasites present unique features compared with other eukaryotes, in particular with regard to RNA processing and maturation mechanisms. For instance, *Trypanosoma brucei* ribosomes contain several specific rRNA expansions and the 60S subunit is composed of eight rRNAs molecules instead of the three rRNAs (5S, 5.8S and 25S/28S) found in other eukaryotes. Along with these differences in rRNA species, differences in pre-rRNA processing are observed, however the role of specific endo and exonucleases in the Trypanosomatids rRNA maturation remains largely unknown. RRP44 is a conserved ribonuclease that associates with the exosome, a multi-protein complex that plays a central role on several pathways related to RNA processing and degradation. Among its multiple functions, eukaryotic exosome catalyzes the 3' trimming of the 7S pre-rRNA to yield mature 5.8S rRNA. Previous studies in *T. brucei* and *Leishmania* were unable to detect the association of RRP44 with the exosome core, however it was shown in *T. brucei* that depletion of individual exosome subunits, including TbRRP44, causes accumulation of full-length or incompletely processed 7S pre-rRNA species. Although RRP44 presents endo and exonuclease activities, its role in endonucleolytic cleavage of the rRNA precursor has hardly ever been studied. We are performing structural and functional characterization of *T. brucei* RRP44 in order to investigate its role in ribosome biogenesis and in specific steps of the rRNA maturation. In parallel to the production and purification of the recombinant protein for structural studies, TbRRP44 knockdown cells were generated to perform phenotypic characterization. Full-length TbRRP44 and two variants including the exo and the endonuclease domains were overexpressed in *E. coli*, purified by chromatographic methods and submitted to crystallization. Promising crystals were obtained for the variant containing the N-terminal and the endonuclease PIN domains. The overall folding of the purified proteins and the effect of Zn binding on the protein structure were analyzed by circular dichroism. Downregulation of TbRRP44 was obtained by applying the RNA interference (RNAi) technique. Proliferation curves of TbRRP44 knockdown and control cells confirmed that RRP44 is essential for the parasite viability. Moreover, analysis of 40S, 60S, 80S subunits and polysomes by sucrose gradient sedimentation showed remarkable differences between knockdown and control cells, with the enrichment of lighter molecular species in RNAi-induced cells. After 72 hours of RNAi induction, the phenotype was intensified and the polysomes virtually disappeared. Our future work includes the analysis of pre-rRNA processing intermediates by qPCR to investigate the role of TbRRP44 in the cleavage of specific



internal transcribed spacers. In addition, crystals of the TbRRP44_NPIN construct will be submitted to X-ray diffraction for 3D structure determination. The knowledge of the 3D structure of this variant will allow a detailed analysis of the RRP44 interface involved in the protein association with the exosome core subunits.



44. DETERMINAÇÃO DA CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO E RECICLAGEM DE ADAM23 ATRAVÉS DO MÉTODO DE BIOTINILAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE CELULAR.

Ingrid Larissa Melo de Souza; Lays Camargo Pederiva; Silvio Marques Zanata.

Departamento de Patologia Básica, UFPR, PR, Brasil.

E-mail: ingridlms@yahoo.de

Introdução: ADAM23 é uma proteína transmembrânica, membro da família ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*), expressa predominantemente no sistema nervoso central tanto no desenvolvimento quanto na fase adulta. Sabe-se que ADAM23 possui um importante papel no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Entretanto, pouco se sabe sobre as vias de internalização dessa molécula, seu direcionamento endossomal para a degradação lisossomal ou sua reciclagem para a membrana plasmática. **Objetivo:** Padronizar o método de marcação de proteínas de superfície celular com biotina derivatizada com grupo sulfo-NHS-disulfeto e empregar este método no estudo da renovação (internalização e reciclagem) de ADAM23 na membrana plasmática. **Metodologia:** Células das linhagens humanas SHSY-5Y (neuroblastoma) e HEK-293T (epitélio renal) foram transfectadas transientemente com o vetor pcDNA3.1-ADAM23, submetidas à incubação com biotina derivatizada (sulfo-NHS-SS-biotin) por 30 minutos a 4°C para marcação das proteínas de superfície celular, seguido de bloqueio das biotinas livres com 0,1 M de glicina. Em seguida, deu-se início à internalização, incubando-se as células a 37°C sob diferentes tempos (15 min., 30 min. e 1 hora). Como controle foram empregadas células mantidas por 1 hora a 4°C. Após a internalização nos diferentes tempos, as células foram submetidas ao tratamento de remoção de biotina das proteínas de superfície não internalizadas (*stripping* da biotina) com dois diferentes agentes redutores (GSH e TCEP) (GABRIEL *et al.*, 2009; STAUTZ *et al.*, 2012). As proteínas ADAM23 biotiniladas e internalizadas foram então purificadas por cromatografia de afinidade à streptavidina-agarose (*pull-down*) e analisadas por *western blotting* empregando anticorpos monoclonais anti-ADAM23. **Resultados e Discussão:** Foi observado em ambas as linhagens celulares um ciclo de internalização da ADAM23, em que essa proteína parece ser internalizada em 15 min., reciclada de volta para a membrana plasmática em 30 min. e novamente internalizada em 1 hora. Embora esse ciclo tenha sido identificado em ambas as linhagens, em HEK293T só foi possível observar a forma não-processada de 100 kDa com esse padrão de internalização, não tendo sido detectada a forma processada de 70 kDa. Por outro lado, na linhagem SHSY-5Y foram observadas ambas as formas 100 kDa e 70 kDa, apresentando apenas a forma madura o padrão de internalização descrito acima. Esse achado pode ser comparado aos resultados obtidos para ADAM12, onde a internalização parece ocorrer apenas para a forma processada (matura) e a reciclagem parece ocorrer em 15 min. em HEK293VnR (STAUTZ *et al.*, 2012). **Conclusão:** A ADAM23 parece ser internalizada em 15 min., reciclada de volta para a membrana plasmática em 30 min. e novamente internalizada em 1 hora,



indicando um ciclo de internalização e reciclagem em ambas as linhagens celulares de origens embrionárias diferentes, SHSY-5Y e HEK293T. Apesar de parecer haver uma semelhança no mecanismo de internalização dessa proteína independentemente do tipo celular, a linhagem neuronal SHSY-5Y apresenta a maquinaria mais apropriada para a internalização, tráfego e processamento da ADAM23, uma vez que, a expressa endogenamente. O tempo de internalização e reciclagem parece diferente e específico para cada membro da família das ADAMs. Ainda serão realizados outros ensaios de internalização da ADAM23 para identificar a via de internalização e o seu tráfego endossomal de degradação ou de reciclagem para a membrana plasmática.



45. AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DO SNP rs16942 DO GENE BRCA_1

Isabella Silvestre Barreto Pinto¹, Lucio Marco de Lemos¹, Claudia C. C. Ota²

¹ Lemos Laboratório de Análises Clínicas, Juiz de Fora - MG

² Universidade Federal do Paraná, Curitiba

E-mail: claudia.ota@gmail.com

Introdução: Aproximadamente 10% dos casos de câncer de mama são classificados como hereditários e o gene BRCA_1 está associado a aumento de risco de 80% de desenvolver a doença. Este gene é um supressor de tumor e alterações na sua sequência estão associadas a perda de função de reparo de erros no DNA, fator que pode ocasionar alterações genéticas levando ao surgimento do câncer. Exames preditivos como o de Câncer de Mama tem sido cada vez mais utilizados e um dos polimorfismos mais prevalentes em pacientes com a doença é o SNP rs16942 do gene BRCA_1. No entanto, é importante ressaltar que o exame apenas indica o risco de ocorrência da doença, não afirma que a paciente vá desenvolver câncer de mama. O objetivo dos autores neste trabalho foi avaliar a frequência alélica e genotípica do SNP rs16942 na população avaliada. **Metodologia:** Para avaliar a frequência do SNP rs16942 foram genotipadas 165 amostras de pacientes que se submeteram aos exames genéticos em um Laboratório na cidade de Juiz de Fora MG, durante o ano de 2016. Para a extração do DNA utilizou-se um kit comercial de acordo com as recomendações do fabricante. A identificação dos genótipos foi realizada no equipamento *7500 Fast Real Time PCR System* por meio da técnica *SNP Genotyping*. **Resultados e Discussão:** Para o SNP avaliado são identificados dois alelos: C (alelo normal) e T (alelo mutante). A frequência dos alelos na população estudada foi de 37,08% (C) e 62,92% (T) e a frequência genotípica foi de 14,60% para CC (homozigoto normal), 44,94% para CT (heterozigoto) e 40,45% para TT (homozigoto mutante). A maior frequência do alelo mutante na população avaliada está em acordo com os demais estudos realizados por outras unidades de pesquisa, onde a frequência e correspondência do alelo "T" é altamente associada ao câncer de mama. Portadoras do alelo mutante apresentam maior risco de desenvolver câncer de mama em algum momento da vida, mas não é possível afirmar que a doença irá se manifestar. Uma vez que o resultado seja positivo para alterações no gene BRCA_1 o paciente deve procurar orientação médica para obter orientações e determinação do tratamento preventivo. **Conclusões:** Com base nos valores encontrados no presente estudo podemos reafirmar a importância de se realizar exames genéticos preventivamente. Pacientes com histórico familiar de câncer de mama devem se submeter a exames genéticos para identificação de possíveis mutações relacionadas ao desenvolvimento da doença, uma vez que fatores hereditários e associados a polimorfismos no gene BRCA_1 estão relacionados a cerca de 80% dos casos de câncer de mama. O resultado positivo não é o fim da linha, apenas o início de um ciclo de cuidados.



46. OS EFEITOS DA SUPEREXPRESSION E DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE PUMILIO DURANTE A CARDIOMIOGÊNESE DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS

Isabelle Leticia Zaboroski Silva¹, Daniela Fiori Gradia², Patrícia Shigunov¹.

¹ Instituto Carlos Chagas, Fiocruz PR, Curitiba, PR

² Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

E-mail: isabelle.lzsilva@gmail.com

A regulação pós transcricional em células-tronco embrionárias (ESC) desempenha um papel fundamental na biologia dessas células. Diversos trabalhos demonstram que múltiplos mRNAs são co-regulados por uma ou mais proteínas de ligação a RNA (RBPs) que orquestram sua expressão. As proteínas PUF formam uma família de RBPs evolutivamente conservadas e as proteínas Pumilio (membros dessa família) têm sido associadas com a manutenção do estado indiferenciado de células germinativas em diversos organismos, como *Drosophila*, *C. elegans* e mamíferos. Em humanos, são encontrados dois homólogos dessa família: PUMILIO1 (PUM1) e PUMILIO2 (PUM2). Em estudos com ESC humanas (hESC), PUM2 parece estar associada ao estado indiferenciado dessas células, sendo mais expressa em relação a PUM1. Para buscar entender o papel destas duas proteínas em hESC, esse projeto visa a superexpressão e o silenciamento gênico de PUM1 e PUM2 em hESC, tanto na forma indiferenciada quanto durante a diferenciação cardiomiogênica dessas células. A expressão de PUM1 e PUM2 foi analisada a partir de amostras de cDNA de quatro pontos ao longo da diferenciação cardiomiogênica e diferenciação espontânea, através de RT-qPCR, derivadas de células hESC da linhagem h32.5/GFP. Os pontos analisados correspondem a marcos da diferenciação cardiomiogênica: em D1 há a formação de corpos embrionários (CE), em D4 há o comprometimento com a linhagem mesodermal, em D8 há o comprometimento com a linhagem cardíaca (progenitor cardíaco), e em D15 há a contração dos cardiomiócitos, sendo o fim da diferenciação cardiomiogênica. Já a diferenciação espontânea corresponde a uma diferenciação sem indução, onde as células se diferenciam nos três folhetos embrionários. PUM2 apresentou maior expressão no oitavo dia em ambas as diferenciações. Para PUM1, observamos uma expressão aumentada durante a diferenciação espontânea. Os lentivírus utilizados como ferramenta no processo de silenciamento foram produzidos em células HEK293FT, contendo o vetor pLKO-1. Esse vetor contém sequências de *short hairpin* RNA (shRNA) que reconhecem o mRNA de PUM1 ou PUM2 e induzem sua degradação via complexo RISC. Para o silenciamento simultâneo de PUM1 e PUM2, o vetor de silenciamento para PUM1 contém o gene de resistência à zeocina e o vetor de silenciamento para PUM2 contém o gene de resistência à puomicina, permitindo a seleção de células silenciadas para as duas proteínas. Quanto a superexpressão, o vetor utilizado é o pTO-HA, que contém uma etiqueta HA, seguido do gene de Pumilio, regulado por um operador TET. Células h32.5/GFP são cultivadas em placas de 6 poços por 96 horas, e então transfectadas com o vetor de superexpressão de PUM1,



PUM2 e vetor vazio. A expressão das proteínas Pumilio é induzida pela adição de tetraciclina (1µg/ml) ao meio de cultivo. Após 24 horas, RNA e proteínas são extraídos. O RNA é utilizado para fazer cDNA e analisado por RT-qPCR. O extrato proteico é quantificado por QuBIT 2.0 e analisado por Western Blot. Após silenciamento e superexpressão, confirmados por RT-qPCR e Western Blot de Pumilio, as células são induzidas para diferenciação cardiomiogênica. A análise da diferenciação é feita por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, observando a expressão de GFP, que nesta linhagem é regulada pelo fator de transcrição NKX2-5, envolvido no início da diferenciação cardiomiogênica, e também pela expressão de marcadores como o CD56 (mesoderme) e a Troponina T (cardiomiócito). Análise da expressão de alvos de Pumilio envolvidos no processo de diferenciação são analisados através de RT-qPCR.



47. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FATORES SOLÚVEIS SECRETADOS POR CÉLULAS CARDÍACAS HUMANAS: PAPEL EM TERAPIAS DO SISTEMA CARDIOVASCULAR.

Jhonatan Basso Lino¹, Anny Waloski Robert¹, Alessandra Melo de Aguiar¹, Thamile Luciane Reus²

¹ Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco – Instituto Carlos Chagas, Curitiba – PR – Brasil

² Universidade Federal do Paraná.

E-mail: jhonatanbassolino@hotmail.com

Introdução: As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade no mundo e dentre elas destaca-se o infarto do miocárdio. Atualmente não existe nenhum tratamento eficaz para recuperar esse tecido e a terapia celular tem surgido como alternativa. Previamente nosso grupo foi capaz de isolar células residentes cardíacas humanas, caracterizadas como uma população heterogênea. Buscando entender mais sobre o nicho cardíaco e o papel dessas células residentes cardíacas, trabalhos prévios caracterizaram o seu secretoma e demonstraram que o meio condicionado (MC) dessas células possui atividade biológica sobre o cultivo de células progenitoras. Assim, utilizar uma população celular tecido específica pode ter grande relevância como fonte de fatores bioativos com interesse para futuras terapias celulares.

Objetivos: Obtenção e caracterização de MC obtido de células cardíacas humanas derivadas de ventrículo e avaliação do efeito biológico *in vitro*. **Metodologia:** Após a coleta do MC das células residentes cardíacas de ventrículo (MCV) e de fibroblasto (MC FIBRO) foi realizada uma caracterização das proteínas secretadas por espectrometria de massas. Posteriormente o efeito biológico dos MCs foi testado com ensaios de citoproteção, diferenciação e proliferação (após 7 e 15 dias de cultivo com os MCs). **Resultados:** A caracterização dos MCs demonstrou que o perfil de proteínas identificadas nas duas amostras de MCV (comparado com um perfil previamente caracterizado) foi muito similar, mostrando um perfil característico do secretoma destas células. Quando comparado com o MC FIBRO, apesar de identificarmos cerca de 31 proteínas em comum, também observou-se que algumas foram identificadas exclusivamente em um outro MC, como por exemplo, a interleucina 6 nos MCVs. Os ensaios iniciais de citoproteção com os MCs foram realizados com arsenito de sódio e posterior tratamento com os MCs, porém não foi verificada diferença entre as células tratadas e as condições controles. Interessantemente, o ensaio de proliferação demonstrou que tanto em 7 quanto em 15 dias de cultivo as células H9C2 apresentaram mais células marcadas com Ki67 (expresso nas fases ativas do ciclo celular) em relação ao MNC. Já com relação ao ensaio de diferenciação, observamos visualmente que os tratamentos com os MCs, tanto de ventrículo quanto de fibroblasto, apresentaram uma maior expressão para o marcador cardíaco troponina I, em relação ao meio não condicionado (MNC). **Conclusões:** Nas caracterizações realizadas foi possível identificar um perfil de proteínas secretadas similar entre as amostras de



diferentes MCVs, sendo estas, então, possivelmente encontradas no nicho cardíaco. Porém também foi observado que os MCs de diferentes fontes possuem diferentes composições, o que pode acarretar diferentes funcionalidades biológicas. Para maior compreensão dos processos envolvidos, análises complementares da caracterização proteômica estão em andamento. Com a estratégia utilizada nos ensaios de citoproteção não foi possível ver diferença entre o uso dos MCs ou MNC. Já com relação ao demais ensaios, mostrou-se que os MCVs possuem um potencial de estimular a proliferação em células H9C2 e que, possivelmente, os MCs contêm proteínas que estão estimulando a diferenciação destas células.

Apoio Financeiro: CNPq; Fundação Araucária; Instituto Carlos Chagas



48. PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE *Plasmodium falciparum* E *Plasmodium vivax* USANDO REAGENTES NACIONAIS

Jhully Anni Surdi¹, Joana Darc Neves³, Ana Claudia Graziani Silva¹, Rita de Cássia Pontello Rampazzo^{1,2}, Marco Aurélio Krieger^{1,2}, Alexandre Dias Tavares Costa^{1,2}

¹Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), Curitiba, Brasil

²Instituto Carlos Chagas (ICC), Curitiba, Brasil

³Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM), Porto Velho, Brasil

Email: jsurdi@ibmp.org.br

A malária é uma doença parasitária febril aguda, sendo um grave problema de saúde pública mundial. É transmitida pelo protozoário do gênero *Plasmodium* spp., sendo que quatro espécies infectam o homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*. No Brasil, *P. falciparum* e *P. vivax* tem maior importância epidemiológica e são o objeto de estudo do presente trabalho. A transmissão pode ocorrer diretamente pelo mosquito fêmea *Anopheles* e indiretamente por objetos contaminados, por transfusão ou doação de sangue. A malária é endêmica de várias regiões e não possui vacina eficaz, portanto o diagnóstico rápido e correto é de grande importância. A técnica padrão ouro para o diagnóstico de malária consiste da visualização microscópica do plasmódio. em exame de gota espessa ou esfregaço de sangue. Apesar de considerada padrão-ouro, essa técnica exige profissionais treinados e experientes, além do tempo necessário para o cultivo do parasita. Para a redução da incidência e da mortalidade, existe a necessidade da realização do diagnóstico precoce com técnicas mais sensíveis assim como kits mais baratos, fazendo com que o diagnóstico chegue às regiões necessitadas. Uma alternativa promissora são os métodos moleculares, como a PCR em Tempo Real (qPCR), que é sensível e específica porém tem custo elevado. Diante disso, o objetivo desse trabalho é comparar a eficiência da detecção de *P. falciparum* ou *P. vivax* pela técnica de qPCR, utilizando reagentes nacionais produzidos no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). Pretendemos também testar as qPCR num formato (chamado gelificado) que elimine a dependência de cadeia gelada (freezer -20 °C) para armazenamento e transporte da reação. As reações foram padronizadas e comparadas em duas plataformas diferentes, o equipamento convencional ABI7500 e uma plataforma portátil, chamada Q3. O teste desenvolvido no instrumento ABI7500 consiste na utilização de duas reações com dois alvos cada, dois deles específicos para *Plasmodium* (um para *P. falciparum* e outro para *P. vivax*), e um para um gene humano, usado como controle interno em cada reação. A detecção do gene humano nas reações duplex valida o resultado negativo ao atestar a qualidade dos reagentes e o perfeito funcionamento do instrumento. Para obtenção das curvas padrão, utilizou-se DNA de *P. falciparum* ou *P. vivax*. Ambos DNA foram diluídos a 1:10 até 1:1000, sendo este último o limite de parasitos detectável. Foram realizados testes com amostras de pacientes contendo *P. falciparum* ou *P.*



vivax, em reações armazenadas tanto no formato tradicional líquido quanto no formato gelificado, em ambos os equipamentos (ABI7500 e Q3). Os resultados obtidos para cada um dos formatos de armazenamento (líquido ou gelificado) em ambos os equipamentos (ABI7500 ou Q3) foram semelhantes, sugerindo fortemente que a reação possui igual eficiência em qualquer formato testado. Estes resultados sugerem que a infecção pode ser detectada em locais sem muita infraestrutura, permitindo que um diagnóstico rápido e preciso seja obtido. Estas características ajudariam na eficiência do tratamento em regiões de pouco acesso médico, auxiliando ainda controle e vigilância epidemiológica.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular, Plasmodium falciparum, P. vivax, PCR em tempo real, plataforma Q3.



49.A EXONUCLEASE XRNA E O METABOLISMO DE MRNA EM *Trypanosoma cruzi*

Jimena Ferreira da Costa¹, Saloê Bispo², Mariana Galvão Ferrarini³, Camila Sayuri Tominaga da Cunha⁴, Sheila Cristina Nardelli⁴, Andrea Rodrigues Ávila^{1 4}, Fabíola Barbieri Holetz⁴ e Bruno Dallagiovanna^{1 4}

¹ Universidade Federal do Paraná

² Lund University, Sweden

³ Université Claude Bernard - Lyon, França

⁴ Instituto Carlos Chagas-FIOCRUZ/PR

E-mail: virtualjimena5151@gmail.com

A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorre majoritariamente pelo controle de eventos pós-transcricionais. Dentre estes, mudanças na estabilidade e acesso dos mRNAs à maquinaria de tradução estão diretamente relacionados à adaptação destes parasitas durante o ciclo de vida. Grânulos de mRNA, como os *P-bodies*, e grânulos de estresse, são compostos por mRNPs e responsáveis por regular a expressão de genes. Os grânulos de estresse estão envolvidos na triagem e estocagem de mRNAs, enquanto os *P-bodies* são sítios de estocagem e/ou degradação de diversos transcritos. Além disso, estudos em eucariotos demonstram que estas estruturas podem interagir e trocar seus componentes num ciclo dinâmico com o intercâmbio de mRNAs entre tradução, estocagem e degradação. Em tripanossomatídeos, algumas proteínas marcadoras de grânulos de estresse e *P-bodies* já foram identificadas, entre elas a DHH1 e a XRNA. Entretanto, a função destes grânulos ainda não foi completamente elucidada. Neste trabalho decidimos investigar a participação da exonuclease *TcXRNA* e sua relação com grânulos de mRNA em *T. cruzi* para ajudar a definir o papel destes grânulos. Nós verificamos que a proteína *TcXRNA*, uma exonuclease 5'→3' conservada e considerada uma marcadora de *P-bodies* em leveduras e mamíferos, é constitutivamente expressa ao longo da metaciclogênese do *T. cruzi* e localiza-se principalmente em *foci* citoplasmáticos. Além disso, observamos que a proteína *TcXRNA* está presente em grânulos citoplasmáticos ao redor do núcleo, mais evidenciada em parasitas na fase G2 do ciclo celular. Ensaios de imunofluorescência mostraram que quando o parasita tem o processamento de transcritos impedido pela ação da droga sinefungina, ocorre maior acúmulo de *TcXRNA* em *foci* perinucleares. Verificamos também, co-localizações parciais entre *TcXRNA* e outras proteínas de grânulos de mRNA como *TcDHH1* e *TcCAF1*, além das proteínas *TcPABP1* e *TcPABP2*, as quais, em outros eucariotos, estão envolvidas em diversas etapas da regulação da expressão de genes, sugerindo assim a co-existência de grânulos distintos em *T. cruzi*. Diante destes resultados, buscamos entender como ocorre a dinâmica dos mRNA entre a tradução, estocagem e degradação em epimastigota e epimastigota submetidos a estresse nutricional. Para isso, utilizamos três estratégias: 1) identificar a população poli(A)⁺ total 2) identificar os mRNAs



associados a polissomos através da técnica de *Ribosome Profiling* e 3) identificar os mRNAs associados as proteínas *TcXRNA* e *TcDHH1* mediante imunoprecipitação e posterior sequenciamento. A análise do sequenciamento massivo de RNA mostrou que na população de RNA poli(A)⁺ das formas epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional, apenas 2% dos genes estão diferentemente expressos. No entanto, através do sequenciamento dos fragmentos de mRNA obtidos por *Ribosome profiling* verificamos que, embora quase a totalidade dos transcritos estejam presentes em ambas as condições de crescimento, apenas 45% dos transcritos traduzidos são comuns entre as duas condições. Esta redução na síntese de proteínas sugere fortemente que o controle traducional seja o mecanismo de regulação gênica predominante em *T. cruzi* durante o estresse nutricional. Já, os dados de sequenciamento das imunoprecipitações dos mRNAs nos mostrou que os grânulos de *TcXRNA* e *TcDHH1* não compartilham mRNAs entre si sugerindo fortemente que estes grânulos apresentem funções especializadas. Quando comparamos os mRNAs presentes nos grânulos com os mRNAs presente nos polissomos, observamos que *TcXRNA* compartilha alguns mRNAs com a maquinaria de síntese de proteínas em parasitas sob estresse. Entretanto, nossas análises indicam que *TcDHH1* não compartilha mRNAs com os polissomos sugerindo que os transcritos presentes nesses grânulos estejam em processo de degradação. Os dados obtidos descrevem o ciclo dinâmico dos mRNAs entre as maquinarias de estocagem, degradação e tradução e que os grânulos de *TcXRNA* e *TcDHH1* têm papel importante no controle da expressão gênica em *T. cruzi*.

Palavras chaves: XRNA, *p-bodies*, grânulos de mRNA, *Trypanosoma cruzi*.



50. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES EXPRESSANDO PEPTÍDEOS LIGANTES À SUPERFÍCIE DE *Trypanosoma cruzi*.

José Luis Sáenz¹, Juliana Ferreira², Wanderson Darocha¹.

¹ Universidad Federal do Paraná, Depto. Bioquímica

² Universidad Federal do Paraná Departamento de Patología.

E-mail: wandersondarocha@gmail.com

Introdução: A doença de Chagas é causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, e é um problema de saúde em toda América Latina afetando 6-8 milhões de pessoas. Em vários países da América Latina há uma alta taxa de transmissão do parasito via vetorial, por insetos vetores de espécies da família Reduviidae, contudo o parasito também pode ser transmitido de forma congênita, transfusão sanguínea/ transplante de órgãos, ingestão de alimentos contaminados, etc. O parasito apresenta variados fatores de virulência, principalmente proteínas de membrana que facilitam a invasão celular e/ou evasão da resposta imune, tornando-se prováveis alvos para o desenvolvimento de moléculas ligantes que possam interferir no processo de infecção. **Metodologia:** Foram utilizadas duas bibliotecas de peptídeos aleatórios no formato LX₁₅ ou LX₈CX₈ (onde X é qualquer aminoácido) em ensaios de incubação com parasitos intatos. Depois de três *pannings* se realizaram testes de recuperação de bacteriófagos para avaliar a ligação dos bacteriófagos isolados do terceiro *panning* contra a cepa alvo e outras cepas de *T. cruzi*. **Resultados e discussão:** Resulto uma considerável recuperação de bacteriófagos demonstrando que existe um bom grau de afinidade com a superfície do parasito. As condições dos bacteriófagos que demonstraram uma melhor ligação no parasito foram a 4 °C e com o parasito vivo. As regiões de DNA que codificam os peptídeos nos bacteriófagos ligantes foram amplificadas por PCR e o DNA purificado sequenciado pelo método de Sanger. O peptídeo foi sintetizado demonstrando afinidade para o parasito em testes de ligação *in vivo* e ELISA. O seguinte é testar a capacidade ligante e de interferência no desenvolvimento do parasito no vetor, uma estratégia chamada de controle paratransgênico, onde as moléculas prejudiciais para o parasito são expressas por microrganismos simbioses do vetor. Paralelamente, foram geradas linhagens expressando genes marcadores que serão utilizados como ferramentas no ensaio de iteração peptídeo parasito *in vivo*.



51. EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA PROTEÍNA KIN DE *Homo sapiens*

José Renato Pattaro Júnior¹, Quirino Alves de Lima Neto², Ícaro Putinhon Caruso³, Francisco Ferreira Duarte Junior², Marcelo Andrés Fossey³, Fátima Pereira de Souza³, Maria Aparecida Fernandez², Flávio Augusto Vicente Seixas¹

¹ Departamento de Bioquímica. Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR, Brasil

² Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil

³ Departamento de Física, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

E-mail: pattoze@gmail.com

A proteína KIN foi identificada em 1989 em células de rato a partir da reação cruzada de anticorpos policlonais mono-específicos, dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli*. O gene *HSA*KIN codifica uma proteína nuclear de 45 kDa que possui a capacidade de se ligar a ácidos nucleicos. Entre os eucariotos, o gene *KIN* é conservado filogeneticamente, o que indica atividade funcional em processos biológicos indispensáveis. Em murinos, a proteína KIN está associada à cromatina formando focos de replicação por todo o nucleoplasma, similar àqueles observados com outras proteínas envolvidas no reparo do DNA, na replicação e no *splicing*. A proteína KIN é composta estruturalmente por motivos particulares: um dedo de zinco, um domínio de hélice alada (*Winged Helix Domain*), um domínio homólogo a proteína recA de *E. coli* e um motivo KOW. No entanto, a completa estrutura tridimensional da proteína KIN humana ainda não foi resolvida por métodos experimentais e nem por modelagem *in silico*, devido à falta de moldes estruturais para a maioria da sequência, indicando uma estrutura ímpar para essa proteína. Posto isso, nosso grupo se propôs a realizar a caracterização biofísica da proteína KIN humana sintetizada heterologicamente em *Escherichia coli* BL21 (DE3), utilizando a técnica de espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) para a determinação das porcentagens dos componentes de estrutura secundária e dos parâmetros biofísicos, Entalpia de desnaturação (ΔH_m) e Temperatura de *melting* (T_m), ainda não efetuados e que futuramente poderão contribuir para a elucidação das funções celulares de KIN. Bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pET23a-d(+) (Novagen), contendo a sequência codificante da proteína *HSA*KIN, foram induzidas com IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo) para promover a superprodução da proteína de interesse. Posteriormente, as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade em FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) e tiveram seus tampões trocados em



coluna de exclusão molecular por tampão opticamente inerte. Depois de purificadas e concentradas, as amostras foram submetidas a análise por Dicroísmo Circular. Utilizou-se o servidor EDBCP (*Ensemble-based Disulfide Bonding Connectivity Pattern Prediction*) para a predição de ligações dissulfeto intracadeia para $_{HSA}KIN$ a partir da sua sequência de aminoácidos. A determinação das porcentagens dos elementos de estrutura secundária da proteína purificada foi realizada para os pHs 6,4 e 7,4, por meio da deconvolução do espectro de CD a 20 °C. A proteína $_{HSA}KIN$ possui 52% de sua composição de elementos não estruturados, voltas- β e *random coils*, seguido de folhas- β , 30% e 31%, e em menor porcentagem de α -hélices, 18% e 17%, para os pHs 6,4 e 8,4, respectivamente. Esses resultados sugerem, com base que regiões não enoveladas podem se inter-relacionar com uma coleção de parceiros na organização de complexas redes de interação proteína-proteína, assim, tais elementos podem auxiliar na formação de complexos proteicos de alto peso molecular que agem nos processos aos quais $_{HSA}KIN$ foi relacionada. Os resultados de desnaturação térmica em dicroísmo circular mostraram os parâmetros biofísicos ΔH_m , 241 e 279 $KJ.mol^{-1}$, e T_m , 45,6 e 50,5 °C, para os pHs 6,4 e 7,4, respectivamente. Esses valores são relativamente baixos e, provavelmente, se devem a esta proteína não possuir nenhuma ponte dissulfeto intra-cadeia, mesmo contando com 7 cisteínas em sua sequência. Concluímos, assim, que KIN exibe uma estrutura altamente dinâmica devido à alta porcentagem de elementos não estruturados e que essas regiões poderiam auxiliá-la na formação de complexas redes de interação proteína-proteína. A não ocorrência de ligações dissulfeto pode ser devido a diversos impedimentos estéricos impostos pela estrutura enovelada da proteína, promovendo assim uma estabilidade térmica reduzida para a proteína KIN.



52. VESÍCULAS EXTRACELULARES DE *Trypanosoma rangeli* MODULAM A EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS E DE CITOCINAS EM CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENO HUMANAS *IN VITRO*

Juliana Bernardi Aggio¹, Rosiane Valeriano da Silva¹, Guilherme Ferreira Silveira¹, Samuel Goldenberg¹, Iriane Eger², Priscilla Fanini Wowk¹

¹ Instituto Carlos Chagas/ Fiocruz-PR, Curitiba, Brasil;

² Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brasil.

E-mail: juhaggio@gmail.com

Introdução: A doença de Chagas é resultado de disfunções imunológicas desencadeadas no hospedeiro a partir da infecção por *Trypanosoma cruzi*. Como mecanismo de imuno evasão, *T. cruzi* secreta vesículas extracelulares (VEs) que carregam moléculas funcionais (proteínas e pequenos RNAs). *Trypanosoma rangeli*, protozoário não patogênico para humanos, pode desencadear uma imunidade protetora a *T. cruzi* em animais sensibilizados devido ao compartilhamento de antígenos de membrana. Desta forma, foi avaliado o efeito imunomodulador de VEs de *T. rangeli* em monócitos e células dendríticas (CDs) humanos e se estas VEs influenciam a infecção *in vitro* de *T. cruzi* nestas células. **Metodologia:** VEs derivadas de formas epimastigotas de *T. rangeli* foram purificadas por ultracentrifugação (100000 x g), e caracterizadas morfológica e dimensionalmente por microscopia eletrônica e *Nanotracking Particle Analysis*. A cinética de interação de VEs de *T. rangeli* tratadas com o intercalante lipídico PKH26 com células Vero, monócitos e CDs foi observada pelo sistema Operetta. Monócitos humanos CD14⁺CD11b⁺ de sangue total periférico e CDs CD14⁺CD11c⁺ derivadas de monócitos humanos foram estimuladas durante 24 e 48 horas com 1000 ng/ poço de VEs de *T. rangeli* e avaliadas *in vitro* por citometria de fluxo quanto a imunofenotipagem de moléculas ativadoras (CD40 e CD83), coestimuladoras (CD80 e CD86) e de HLA-DR. A determinação da secreção de citocinas pró-inflamatórias de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) após 24 e 48 horas de estímulo com VEs de *T. rangeli* foi feita por *Cytometric Bead Array*. A ativação de linfócitos humanos CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ tratados com CFSE foi verificada por ensaio de proliferação após 5 dias de cocultura com monócitos CD14⁺ estimulados durante 24 horas com VEs de *T. rangeli*. A infectividade de *T. cruzi* Y - CFSE foi avaliada após 15 horas de interação com monócitos CD14⁺ e CDs CD11c⁺ estimulados durante 24 horas com VEs de *T. rangeli*. **Resultado e Discussão:** Visualizou-se por microscopia eletrônica a secreção de VEs da superfície de epimastigotas de *T. rangeli* e VEs isoladas com morfologia característica e tamanho médio de 176,7 ± 54,0 nm. Essas VEs parecem ser internalizadas nas células avaliadas a partir de 2 horas de interação. A estimulação com VEs de *T. rangeli* induziu aumento (p>0,05) na frequência de monócitos CD14⁺CD11b⁺CD40⁺ após 24 e 48 horas, redução na frequência de CD14⁺CD11b⁺HLA-DR⁺ após 24 e 48 horas e de CD14⁺CD11b⁺CD86⁺ após 48 horas de cultura, de forma concentração dependente. Após 24 horas, o estímulo de VEs de *T. rangeli* aumentou a expressão de CD40 e de



CD83, e reduziu a expressão de HLA-DR em CDs CD14+CD11c+ ($p>0,05$). Houve aumento da secreção de IL-8 por PBMCs após 24 e 48 horas de estímulo com VEs de *T. rangeli* e aumento de IL-1 β e IL-6 após 48 horas. A estimulação prévia com VEs de *T. rangeli* reduziu ($p>0,05$) a proliferação de linfócitos CD3+CD4+ e CD3+CD8+ em cocultura com monócitos CD14+. Finalmente, a estimulação prévia de monócitos e CDs com VEs de *T. rangeli* alterou discretamente a susceptibilidade celular à infecção por *T. cruzi* Y. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que as VEs de formas epimastigotas de *T. rangeli* ativam *in vitro* células apresentadoras de antígenos humanas e modulam negativamente moléculas relacionadas à apresentação de antígeno. VEs de *T. rangeli* podem reduzir a proliferação de linfócitos e interferir na susceptibilidade de monócitos e CDs a infecção *in vitro* por *T. cruzi*. Esses dados vem sugerindo potencialização da invasão de *T. cruzi* pela ação das VEs de *T. rangeli*, refutando a hipótese de que antígenos de *T. rangeli* carreados em suas VEs poderiam induzir uma resposta protetora contra *T. cruzi in vitro*.



53. CARACTERIZAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA MIGRAÇÃO INDUZIDA PELA ATIVIDADE DE QSOX1 EXTRACELULAR EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA (VSMC).

França, K.C., Nakao, L.S.

Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Curitiba 81531-980, Brasil.

E-mail: karime_bio@yahoo.com.br

Introdução: A migração celular possui importante papel na restenose, que consiste na reobstrução do lúmen do vaso sanguíneo após a técnica da angioplastia por cateter balão. Estudos vêm associando a regulação de processos migratórios celulares com moléculas oxidantes, estabelecendo espécies reativas (ROS) como importantes sinalizadores nesse processo. Tioi proteínas estão cada vez mais evidentes na sinalização redox, inclusive a proteína QSOX (quiescina sulfidil oxidase), uma tioi oxidase dependente de FAD (flavina adenina dinucleotídeo) que catalisa a oxidação de di(tiois) à dissulfeto, com a redução concomitante do oxigênio molecular (O₂) à peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Recentemente, foi demonstrado que a proliferação e a migração de VSMC são dependentes da atividade de QSOX1 extracelular (BORGES *et al.*, 2015). Desta forma, o objetivo do trabalho foi investigar a participação do subproduto da atividade da QSOX1 extracelular, o H₂O₂, na indução da migração de VSMC. **Metodologia:** VSMC foram obtidas pelo método de explante (adaptado de KIRSCHENLOHR *et al.*, 1996), a partir de ratos Wistar machos com 250g. Foram utilizadas construções da isoforma curta da proteína QSOX1: *wild type* (mQSOX1) (PORTES *et al.*, 2008) e a mutante inativa (mQSOX1C452S) obtida por mutação do primeiro resíduo de cisteína do segundo motivo CXXC do construto *wild type*, por Megaprimer PCR (BORGES *et al.* 2015). A atividade sulfidril oxidase foi determinada conforme descrito em Raje *et al.*, 2002. Os ensaios de migração foram realizados pelo método de *scratch* (adaptado de LIANG *et al.*, 2007), na presença das proteínas recombinantes e/ou Mitomicina C 0,4µg/ml, PEG-CAT (polietileno glicol catalase) 200 U/mL, DPI (difenilenoiodonio) 20µM e PEG-SOD (polietileno glicol superóxido dismutase) 25U/ml. Como controle positivo foi utilizado PDGF-BB 20 ng /mL. **Resultados e Discussão:** Foi confirmado que, de forma semelhante ao PDGF (indutor característico de migração em células vasculares), VSMC expostas à mQSOX1 exibiram um aumento da taxa de migração quando comparada à mQSOX1C452S. A possibilidade de ser uma resposta proliferativa foi excluída através de ensaios de migração com o agente inibidor da síntese de DNA, a Mitomicina, que não impediu a atividade migratória das células tanto na presença de PDGF-BB como na de mQSOX1. Em seguida, foi demonstrado que PEG-CAT, consumidora de peróxido de hidrogênio intracelular, e DPI, inibidor de uma das principais origens de ROS, a NADPH oxidase, atenuaram significativamente a migração de VSMC induzida pela mQSOX1 e por PDGF-BB. Em contrapartida, ao expor às células à PEG-SOD, catalisador da dismutação do superóxido em O₂ e H₂O₂, a migração em VSMC mostrou-se potencializada em todos os tratamentos, mas mantendo em evidência a ação da



recombinante ativa na indução do processo migratório. A migração induzida pelo PDGF-BB também foi evidente pela incubação com PEG-SOD. Estes dados evidenciam o H₂O₂ intracelular como um mediador na migração de VSMC estimulada pela QSOX1 extracelular. **Conclusão:** Estes dados confirmaram que a atividade sulfidril oxidase da QSOX1 induz migração de VSMC. Além disso, foi demonstrado que o subproduto reacional dessa proteína, o H₂O₂, está envolvido nas vias de sinalização desse processo migratório.



54.O PAPEL DA AUTOFAGIA NO CRESCIMENTO *in vivo* E NA RESPOSTA À TERAPIA EM GLIOMAS

Karina Bettega Felipe^{1 2}, Emilly Vilodre¹, Marcos Thomé¹, Francine Hehn de Oliveira³, Patrícia Lopez^{1 4 5}, Guido Lenz¹

¹ Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular-UFRGS

² Departamento de Análises Clínicas- UFPR

³ Unidade de Patologia Experimental –CPE- HCPA

⁴ Programa de Pós-Graduação de Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia-UFRGS

⁵ Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas -Centro de Pesquisa Experimental-HCPA

E-mail:karinabettega@ufpr.br

Uma vez que a autofagia apresenta papel duplo na biologia tumoral, pode prevenir a carcinogênese como também ter efeito pró-tumoral ao final deste processo. Tanto a radioterapia como diversos quimioterápicos ativam a autofagia, mesmo que não seja claro o motivo pelo qual isso ocorre. Nesse contexto, um dos tumores em que a autofagia está alterada é o Glioblastoma Multiforme (GBM), altamente agressivo e invasivo. O tratamento padrão para GBM é ressecção cirúrgica, seguido de quimioradioterapia, com administração de temozolomida (TMZ). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vivo*, o papel da autofagia na ação terapêutica da temozolomida, utilizando-se rapamicina (RAPA) e 3-metiladenina (3-MA) como moduladores desse processo. Células U-87MG foram inoculadas subcutaneamente no flanco de camundongos nude. Quando os tumores atingiram o tamanho de aproximadamente 108 mm³, iniciou-se o tratamento dos animais, os quais foram mantidos por até 60 dias após o tratamento ou até os tumores atingirem o volume de aproximadamente 864 mm³. Uma vez atingidos um dos critérios citados anteriormente, foram coletados o sangue dos animais, os quais posteriormente foram eutanasiados, possibilitando a coleta dos tumores, rins e fígado, utilizados para a confecção de lâminas coradas com hematoxilina-eosina. A análise histológica dos tumores foi realizada a fim de verificar-se o efeito dos tratamentos sobre a celularidade, indução de necrose, verificação de índice mitótico e ocorrência de atipias celulares. Já rins e fígados foram avaliados histologicamente com o intuito de verificar-se alterações morfológicas nesses órgãos relacionadas à indução de toxicidade. A indução de toxicidade pelos tratamentos foi complementada ainda, pela determinação dos níveis séricos de marcadores hepáticos (AST e ALT) e renais (uréia e creatinina). Por fim, cabe ressaltar, que foram determinadas as curvas de crescimento dos tumores, com o intuito de detectar efeitos sobre a resistência dos mesmos à ação da TMZ. Previamente a sua realização, este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Animais do



Hospital de Clínicas (CEUA-HCPA). A análise das curvas de crescimento do tumores, demonstrou que todos os tratamentos foram capazes de reduzir significativamente o volume tumoral, em comparação ao grupo controle. Observou-se, entretanto, a ocorrência de reincidência tumoral 20 dias após a realização dos tratamento com TMZ (10 mg/Kg i.p) e TMZ + 3-MA (25 mg/Kg, intratumoral). Os tratamentos mais efetivos foram as combinações de RAPA (2 mg/K, i.p) + TMZ e RAPA + TMZ + 3-MA, as quais, além de promoverem importante efeito antitumoral, retardaram a ocorrência de resistência à TMZ ao reduzirem significativamente o percentual de tecido viável (pela indução de necrose), quando comparado aos demais grupos experimentais. Animais tratados com RAPA + TMZ apresentaram área focal de necrose, decorrente de maior indução de autofagia mediada pela administração de RAPA; enquanto animais tratados com RAPA + TMZ + 3-MA apresentaram extensa área de necrose, relacionada à intensa indução de autofagia mediada pela administração de RAPA e forte bloqueio do processo mediado pela administração de 3-MA, levando a um colapso celular refletido na extensa indução de morte. Nenhum dos tratamentos causou toxicidade relevante aos animais de acordo com as análises histológicas e bioquímicas. Conclui-se que, neste contexto, a modulação da autofagia constitui uma estratégia terapêutica interessante para sensibilizar células U-87MG a ação da TMZ.



55. PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE EXOSSOMOS PARA ESTUDOS EM CARCINOMAS PRIMÁRIOS DE MAMA

Kathleen Liedtke Kolb¹, Patricia Midori Murobushi Ozawa², Evelyn Vieira², Débora de Sousa Lemos¹, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro², Danielle Malheiros Ferreira¹

¹ Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

² Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

E-mail: paty.mih@gmail.com

O câncer de mama é o segundo câncer que mais acomete mulheres no mundo e devido à sua alta complexidade, há necessidade de desenvolvimento de métodos que permitam estratificar os pacientes permitindo tratamentos mais direcionados e efetivos, aumentando as chances de sobrevivência. Entre os vários grupos de moléculas envolvidas no processo canceroso, os exossomos tem se destacado. O conteúdo armazenado dentro dos exossomos é variado e inclui microRNAs (miRNAs), que parecem ter importante função na resistência ao tratamento quimioterápico, além do potencial de se tornarem marcadores para diferenciar subtipos de câncer de mama, uma vez que o perfil de miRNA de exossomos pode refletir o perfil da célula tumoral. Outro fator que torna essas vesículas atraentes para o uso clínico é a possibilidade de obtenção dos exossomos a partir de métodos não invasivos, como a obtenção a partir de soro do sangue periférico de pacientes com câncer de mama. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar o método de extração e obtenção de amostra enriquecida em exossomos para futura caracterização de seus miRNAs pelo método de sequenciamento de RNAs (RNAseq). Primeiramente, realizamos testes para verificar a eficiência da extração de exossomos pelo *Total exosome isolation kit from serum* (Invitrogen), utilizando o método de quantificação e caracterização de vesículas por análise de rastreamento de nanopartículas (NanoTracking Analysis – NTA). A seguir, realizamos um teste para verificar a influência do volume inicial de soro e tempo de centrifugação no isolamento de RNAs exossomais. Para isso, selecionamos amostras de indivíduo controle e de paciente com câncer de mama, e realizamos as extrações dos exossomos a partir de volumes iniciais diferentes: 300 μ L, 500 μ L e 1000 μ L; utilizando também diferentes tempos de centrifugação: 10 minutos e 30 minutos. A extração do RNA exossomal utilizou o *kit mirVana* (Ambion) e a quantificação foi realizada no equipamento *Bioanalyzer*. Foram realizados testes para comparar diferentes métodos de isolamento de exossomos, por ultracentrifugação e por *kit* comercial, bem como para comparar se havia diferença entre a utilização de soro ou plasma como material inicial, para ambas as técnicas. As amostras foram quantificadas e caracterizadas por NTA, e o miRNA exossomal foi quantificado por PCR em tempo real. Foi observado que o *kit* comercial utilizado foi eficaz no isolamento de exossomos, que estavam dentro do tamanho esperado (até 200nm) e em uma boa concentração. Porém, foram encontrados exossomos no soro depletado de exossomos, mostrando



que há uma perda de exossomos com este método. Com relação ao segundo teste, observamos que uma maior quantidade de volume inicial de soro rendeu uma maior quantidade de RNAs, sendo que o paciente com câncer de mama apesentou uma quantidade muito maior de RNA do que o indivíduo controle. Além disso, observou-se que o tempo de centrifugação não aumentou a quantidade de RNA obtido, mas sim, diminuiu. Dessa forma, concluímos que quanto maior a quantidade inicial de soro, maior é a quantidade de RNA total exossomal obtido, aumentando de forma proporcional, e que o melhor tempo de centrifugação é o de 10 minutos. Não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade e tamanho dos exossomos extraídos por ultracentrifugação e por *kit* comercial, e nem entre soro e plasma extraído por ultracentrifugação. Foi possível comprovar que a extração de RNA está sendo realizada de forma correta, uma vez que o miRNA controle foi quantificado adequadamente por PCR em tempo real. No entanto, observamos que apenas os miRNAs extraídos das amostras isoladas por *kit* comercial conseguiram ser detectadas por PCR em tempo real. Estes resultados reforçam a possibilidade de extração de exossomos e miRNAs exossomais com qualidade e quantidade adequadas por *kit* comercial, utilizando o soro. A partir de então definimos como padrão a utilização de soro como material inicial e que a técnica para isolamento seria a do *kit Total exosome isolation kit from serum* (Invitrogen).

Financiamento: Capes, CNPq e Fundação Araucária



56. INTERACTOME ANALYSIS OF FGFR2 – A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET IN BREAST CANCER.

Kelin Gonçalves de Oliveira, Mauro Antônio Alves Castro.

Universidade Federal do Paraná (UFPR), Programa de Pós Graduação em Bioinformática

E-mail: kelin.g.oliveira@gmail.com

INTRODUCTION: Breast cancer (BC) is a leading cause of cancer death among women and results from multivariate factors of environmental and genetic origin. One of most consistent genetic risk factors for breast cancer is the single nucleotide polymorphism (SNP) rs2981582 that sits inside the intron 2 of the Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) gene. The encoded protein, fgfr2, is a tyrosine kinase receptor that acts as a housekeeping molecule at the mammary tissue – amongst other tissues – and it is implicated in several cellular processes, such as cell cycle control, proliferation, migration, tissue repair and tumorigenesis. It has been demonstrated that the risk SNP rs2981582 is able to modulate the expression of the FGFR2 gene. However, the downstream effects in breast cancer at protein level are yet to be clarified. **METHODOLOGY:** Here we used a data mining approach to reconstruct the fgfr2 interactome from a wide range of databases (STRING, HRPD, IntAct, BIOGRID, DIP, I2D and MINT). **RESULTS:** The resulting curated protein-protein interaction (PPI) network comprises the most significant proteins that establish interactions with the fgfr2 protein in several tissues and in non-tumor conditions. Along with previous studies, the fgfr2 PPI network might provide a rich groundwork to address systemic questions on how fgfr2 might affect signaling pathways related with breast cancer. Once we have concluded the curated PPI network, proper trimming will then be performed in order to map a mammary tissue specific fgfr2 PPI network, which will be validated through knockdown experimental data. **CONCLUSION:** We anticipate that this tissue-specific PPI network will allow us to exhaustively explore other relevant breast cancer risk SNPs in the context of fgfr2 signaling events.

FINANCING SOURCE: *CNPq – National Council of Scientific and Technological Development.*



57. DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE QPCR PARA DETECÇÃO DE *Chlamydia trachomatis* EM AMOSTRAS OCULARES

Keren Kariene Leite¹, Pedro Henrique de Caires Schluga¹, Walleyd Sami Tassi¹, Joana da Felicidade Ribeiro Favacho³, Rita de Cássia Pontello Rampazzo^{1 2}, Marco Aurélio Krieger^{1 2}, Alexandre Dias Tavares Costa^{1 2}

¹ Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), Curitiba, Brasil

² Instituto Carlos Chagas (ICC), Curitiba, Brasil

³ Instituto Evandro Chagas (IEC), Ananindeua, Brasil

E-mail: kleite@ibmp.org.br

O tracoma é uma doença inflamatória ocular crônica causada pela bactéria *Chlamydia trachomatis*. Seu quadro clínico é caracterizado por inflamações recidivantes, iniciando-se com uma simples conjuntivite folicular que progride para cicatrizes na conjuntiva e diminuição da acuidade visual, levando à cegueira. O diagnóstico correto e precoce da infecção causada por *Chlamydia trachomatis* é de grande importância para o controle, vigilância e interrupção do ciclo infeccioso da doença. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, há 21 milhões de pessoas acometidas pela doença no mundo, mais de um milhão de pessoas cegas pelo tracoma e 232 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas. No Brasil, 36% dos estados apresentam prevalência do agente etiológico ativo, sendo o sul e o nordeste as regiões mais afetadas, indicando que há necessidade de combater e reduzir a incidência da doença. Diante disso, o objetivo desse projeto é desenvolver e padronizar um teste diagnóstico baseado em PCR em tempo Real (qPCR), capaz de detectar o DNA da bactéria em amostras clínicas. A detecção de um alvo presente no genoma humano (rRNA 18S) foi usada para garantir a funcionalidade do sistema, avaliando a qualidade do DNA extraído, a presença de inibidores e a integridade dos reagentes. Além disso, o teste foi desenvolvido com insumos nacionais, produzidos pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP/Fiocruz-PR), contribuindo para a redução dos custos de produção. A reação foi padronizada em duas plataformas de qPCR (ABI7500 e a plataforma portátil Q3). Para as reações de padronização da curva padrão de DNA e determinação do limite de detecção, utilizamos DNA comercial de *Chlamydia trachomatis* (ATCC® VR-885D™ e VR-886D™). Para a avaliação do teste, utilizamos amostras clínicas da região endêmica e amostras de pacientes negativos residentes em áreas não endêmicas. Nossos resultados indicam que a reação desenvolvida apresenta alta sensibilidade, detectando 100 atogramas de DNA diluído em DNA extraído de sangue humano. Esta quantidade de DNA corresponde a 0,1 genomas da bactéria, tendo sido obtido em ambos os equipamentos, demonstrando que as plataformas de detecção testadas apresentam resultados semelhantes. Em seguida, foram testadas 50 amostras clínicas obtidas de área endêmica, de pacientes assintomáticos. A qPCR duplex aqui desenvolvida identificou a presença do DNA da bactéria em 48 delas. A falta de detecção do DNA de *C. trachomatis* nas amostras negativas sugere que a qPCR



apresentada é bastante específica. O próximo passo do projeto visa testar as amostras clínicas no equipamento portátil Q3, para posterior comparação com os resultados obtidos no equipamento convencional (ABI7500). Por sua portabilidade, este equipamento possibilitaria o diagnóstico em áreas afastadas de centros de saúde. O uso de um teste diagnóstico baseado em qPCR confere agilidade e sensibilidade analítica necessária ao diagnóstico preciso e ágil da doença, auxiliando na redução da incidência e transmissibilidade da doença.



58. IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ALPHA- AND BETA-AMASTINS FROM *Trypanosoma cruzi*

Laiane Lemos¹, Monica M. Kangussu-Marcolino¹, Normanda Souza-Melo¹, Mariana Santos Cardoso², Santuza M. R. Teixeira³, Wanderson D. DaRocha¹

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, SCB/UFPR, Brasil.

²Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, Brasil.

³Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG, Brasil.

E-mail: laiane.lemos.bio@gmail.com

The amastins are known as differentially expressed genes during *T. cruzi* life cycle, and it has been shown in *T. cruzi* and *Leishmania* that they can be associated to invasion, parasite survival or multiplication in their hosts. *In silico* analysis allowed amastin classification in α , β , γ and δ subfamilies in Trypanosomatids, and identified 14 gene copies of amastins in *T. cruzi* (CL Brener clone), among β - and δ -amastins. In this work, we improved amastin characterization by studying β -amastins through gene deletion by homologous recombination and by identifying new members of these proteins in *T. cruzi*. After searching the unassigned contigs of CL Brener clone, sequences encoding new *T. cruzi* amastins were found. *In silico* analysis identified the presence of domains, transmembrane regions, sequences conservation and genomic organization. These analyses supports that presence of two α -amastins in *T. cruzi*, similarly to other Trypanosomatids. The expression of α -amastins fused to GFP showed distinct cellular distribution for both alpha-amastins, which is a behavior shared with β - and δ -amastins from *T. cruzi*. In addition, unlike the other amastin members found in this parasite, α -amastins appear to have constitutive level of expression during the life cycle of *T. cruzi*. In parallel, we knock out the β -amastins genes by homologous recombination. Two cassettes were transfected into CL Brener epimastigotes and their integration was verified. The deletion of these genes was confirmed by PCR and analyzes are currently being performed to verify possible phenotypic changes from these deletions.



59. GENERATION OF RECOMBINANT PEPTIDES AGAINST TRYPOMASTIGOTE SURFACE PROTEINS OF *Trypanosoma cruzi*: NEW TOOLS TO IMPROVE DRUG DESIGN.

Lara Maria Kalempa Demeu¹, Kelin Gonçalves de Oliveira¹, Rodrigo Jahn Soares¹, Christian Plaza², Nobuko Yoshida², Juliana Ferreira de Moura³, Larissa Alvarenga Magalhães³, Wanderson Duarte daRocha¹

¹Laboratório de Genômica Funcional de Parasitos, Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná – Curitiba – Paraná - Brasil

²Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo – São Paulo – Brasil.

³Laboratório de Imunoquímica, Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná – Curitiba – Paraná - Brasil

The treatment of Chagas disease patients using conventional drugs need some improvement, since it can be inefficient or can cause severe side effects. As shown for *Trypanosoma brucei*, nanobody engineering can be used to improve sleeping sickness treatment. Similar to this approach, here we describe our initial efforts to develop specific molecules that binds to *T. cruzi* cell surface. We have created scFvs based on sequences obtained from previously described monoclonal antibodies or identified peptides by using phage display technology. Thus, variable regions IgG light and heavy chains of hybridomas expressing mAb-10D8 (anti-TcGP35/50), mAb-2B10 (anti-GP35/50), and mAb-3F6 (anti-TcGP82) were sequenced and assembled as scFvs. Synthetic gene of scFv-10D8 was cloned and expressed in *E. coli* as 6xHis fusion protein. Currently, we are optimizing the scFv-10D8 expression conditions to purify functional molecules. In parallel to this efforts, we used fixed metacyclics and tissue culture derived trypomastigotes (MT and TCT respectively) to screen phage display libraries (XCX4CX, XCX8CX, X8CX8, and X15) to identify peptides that binds to the parasite surface. After three rounds of panning, seven clones that recognize TCTs and 3 that bind to MTs were sequenced. From this preliminary sequencing, 5 out of 7 clones encode two distinct peptides. These identified are being tested for TCT binding capacity. Once we confirm the binding capacity of each molecule described here, we plan to test it to ablate *T. cruzi* infectivity.

Supported by: CAPES and CNPq



60. PHOSPHOLIPASE D FROM VENOMS OF *LOXOSCELES* SPIDERS: A STRUCTURAL, BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL COMPARISON

Larissa Vuitika¹, Ricardo Barros Muriutti², Fábio Rogério Moraes², Fernando Hitomi Matsubara¹, Hanna Câmara da Justa¹, Marianna Boia Ferreira¹, Fernando Jacomini de Castro¹, Bruno Cesar Antunes³, João Carlos Minozzo³, Luiza Helena Gremski¹, Andrea Senff Ribeiro¹, Raghuvir Krishnaswamy Arni², Silvio Sanches Veiga¹.

¹ Department of Cell Biology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brazil.

² Multi-User Biomolecular Innovation Center, Physics Department, Paulista State University (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

³ Production and Research Centre of Immunobiological Products, State Department of Health, CPPI, Curitiba, Paraná, Brazil.

E-mail: larissavuitika@hotmail.com

The brown spiders of the *Loxosceles* genus are worldwide distributed and the species *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho* are the main species that cause envenomation in Brazil. The whole venom is rich in many toxins and the presence of the phospholipase D enzymes is highlighted. PLD toxins are experimentally able to cause demonecrosis, hematological disturbers and phospholipids hydrolysis. The goal of this work is the production of recombinant PLD homologous of three species of *Loxosceles* and comparisons among of these inter-specific toxins. First, the cDNA sequence of PLD of *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho* were cloned and expressed in the same expression system. Purified recombinant PLDs were submitted to biophysics studies for secondary structure determination (circular dichroism) and thermal stability analysis (differential scanning calorimetry). Immunodetections were performed using hyperimmune serum anti-LiRecDT1, anti-whole venom of *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. gaucho*. Enzymatic kinetics were obtained by distinct methods: Amplex Red Assay, High-Performed Thin-Layer Chromatography and Nuclear Magnetic Resonance. Cytotoxicity was evaluated by release hemoglobin in the hemolysis kinetics and erythrocytes morphological alterations. In addition, “*in vivo*” tests were realized to determine the capacity to cause demonecrosis and changes in capillary permeability. All recombinant PLDs were successfully expressed in prokaryotic system. CD spectra revealed that toxins were in the soluble form and adopted a native-like conformation, containing alpha-helices and beta-sheets. Based on the thermograms obtained by DSC, we observed that the stability of the homologous remained unaltered. All recombinant toxins were identified by PLD specific and whole venom antibodies, except the PLD of *L. laeta* that not recognized by anti-LiRecDT1. Enzymatic kinetics showed that all toxins are able to hydrolyze phospholipids, but the recombinant PLD of *L. gaucho* demonstrated greater capacity of lysophosphotidylcholyne hydrolysis when compared with the others PLDs. Corroborating with enzymatic kinetics, PLDs are able to cause hemolysis and morphological alterations “*in vitro*”. Preliminary “*in vivo*” assays demonstrated that toxins



are able to cause necrosis and edema but without significant differences. In conclusion, all recombinant PLDs of *Loxosceles* genus are biologically active and suggests that recombinant PLD of *L. gaucho* was the more catalytic toxin.



61. CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE POLPA DENTÁRIA

Letícia Fracaro¹, Luana de Souza Ebbinghaus¹, Bruna Cristina Falavinha², Lidiane Maria Boldrini-Leite¹, Dayane Mayumi Miyasaki¹, Alejandro Correa Dominguez², Alexandra Cristina Senegaglia¹, Paulo Roberto Slud Brofman¹.

¹ Núcleo de Tecnologia Celular - Pontifícia Universidade Católica do Paraná

² Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco – Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ-PR

E-mail: leticiafracaro@gmail.com

As células-tronco mesenquimais (CTM) representam uma população de células multipotentes que tem ampla distribuição em tecidos adultos. O estudo de CTM de diversas fontes é necessário para o desenvolvimento de terapias alternativas para diferentes patologias. As células-tronco mesenquimais de polpa dentária (DPSC) vêm sendo o alvo de inúmeras pesquisas pois são de fácil coleta além de apresentarem alto potencial terapêutico, principalmente para o tratamento de doenças neurodegenerativas e de lesões no tecido nervoso, devido sua origem ectodérmica, mesma origem dos neurônios. Os objetivos deste trabalho foram: caracterizar fenotipicamente e funcionalmente as DPSC por meio de imunofenotipagem e diferenciação em três linhagens; e analisar a expressão do marcador neuronal β tubulinIII em DPSCs após a indução da diferenciação neuronal. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da PUCPR (CAAE:42751615.8.0000.0020). As polpas dentárias (n=3) foram removidas de terceiros molares coletados na Clínica de Odontologia da UFPR após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos doadores. No laboratório, as polpas foram seccionadas em pequenos pedaços e dissociadas com o auxílio de colagenase tipo I. As DPSC foram cultivadas em IMDM suplementado com 15% de soro bovino fetal em incubadora umidificada, à 37°C com 5% de tensão de CO₂ e entre a passagem 4 e 5 foram submetidas a caracterização imunofenotípica e a diferenciação. Para a caracterização imunofenotípica foi utilizado um painel de anticorpos sugeridos pela International Society for Cellular Therapy para a definição de CTM. As DPSC foram diferenciadas em 4 linhagens (adipogênica, osteogênica, condrogênica e neuronal) durante 21 dias com troca de meio três vezes por semana. Para a confirmação das diferenciações foram utilizados os seguintes corantes: Oil Red (adipogênica), vermelho de alizarina S (osteogênica) e azul de toluidina (condrogênica). Já para a diferenciação neuronal, as células foram marcadas com o anticorpo anti- β tubulinIII e analisadas por técnica de imunofluorescência. As DPSC apresentaram aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, perfil imunofenotípico positivo para os marcadores CD29, CD73, CD90, CD105, CD166 e expressão reduzida para CD14, CD19, CD34, CD45, HLADR. Essas características morfológicas e imunofenotípicas são comuns com CTM de outras fontes como medula óssea e tecido adiposo. Nas DPSC foi possível observar a diferenciação osteogênica e condrogênica porém não a adipogênica. Trabalhos já descreveram a diferenciação nas



três linhagens, contudo alguns autores não conseguiram observar a diferenciação adipogênica, e descreveram também, que não foi possível observar a formação de vacúolos lipídicos corados com Oil red, mas comprovaram que houve diferenciação através da expressão de FABP. Esta diferenciação pode ocorrer de maneira mais tardia nas DPSC, após 5 semanas segundo autores. Uma análise da expressão de genes relacionados a adipogênese poderia indicar se houve diferenciação nas DPSC deste estudo. Após a diferenciação neuronal seguida da marcação, foi possível observar a expressão da β tubulinaIII nas DPSC diferenciadas. Nas células mantidas apenas com o meio controle, não foi possível observar essa expressão. Alguns autores demonstram essa característica das DPSC de expressar marcadores neuronais após a diferenciação. Conforme já descrito, as DPSC podem apresentar outros marcadores neuronais além da β tubulinaIII, como Nestin e GFAP demonstrando que essas células possuem um potencial de diferenciação neuronal maior do que CTM de outras fontes. Foi possível demonstrar neste estudo que as DPSC são de fácil obtenção e expansão em cultura. Além disso, possuem características similares a CTM obtidas de outros tecidos podendo ser utilizada como uma fonte alternativa de células-tronco. Utilizando a técnica de imunofluorescência nas DPSC, após a indução da diferenciação neuronal, foi possível detectar a expressão da β tubulinaIII. Devido ao seu potencial de diferenciação neuronal as DPSC podem ser uma excelente opção em futuros estudos *in vitro* e *in vivo* de patologias neurodegenerativas.

Agência financiadora: Fundação Araucária/CAPES



62. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *TPM1*, *2*, *3* E *4* EM CARCINOMAS MAMÁRIOS E TECIDO NÃO TUMORAL

Letícia Wons, Fabiano Santos Ramos, Heloisa Magagnin Brincas, Tayana Schultz Jucoski, Cecília Mayumi Shimoida de Carvalho, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro e Iglénir João Cavalli.

Universidade Federal do Paraná

E-mail: leli@wons.com.br

Células cancerosas apresentam ciclo celular irregular o que pode conferir a capacidade de se dividir descontroladamente e migrar para tecidos adjacentes e/ou distantes. O câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres, excluindo o câncer de pele do tipo não melanoma. Em 2012, foram diagnosticados 1.67 milhões de novos casos mundiais e 57.960 novos casos estimados para o Brasil em 2016 (GLOBOCAN, 2012; INCA, 2016). Muitos processos estão envolvidos com desenvolvimento do câncer, por exemplo alterações em proteínas e genes. As tropomiosinas (TPM) são proteínas diméricas que fazem a ligação com filamentos de actina. Há 4 tipos de genes de tropomiosinas em humanos: *TPM1*, *TPM2*, *TPM3* e *TPM4* que possuem isoformas decorrentes do embaralhamento das bases. Modificações na estrutura do citoesqueleto de actina promovem aumento da motilidade, invasão e mudanças morfológicas nas células do tumor contribuindo com o processo carcinogênico. Estudos anteriores de proteômica demonstraram que altas expressões de *TPM1*, *TPM2*, *TPM3* e *TPM4* em carcinomas mamários em relação a linfonodos metastáticos. Para melhor entendimento dos genes que codificam para essas proteínas, neste estudo foi analisado a expressão gênica de 47 amostras de carcinomas ductais mamários. O gene *TPM1* se demonstrou menos expresso em relação ao grupo não tumoral, porém o resultado não foi estatisticamente significativo. Esta redução da expressão desestabiliza a arquitetura do microfilamento permitindo que as células neoplásicas possam adquirir resistência a apoptose que poderá culminar na invasão. A maior expressão deste gene foi observada em pacientes com grau III e presença de metástases nos linfonodos, características que estão relacionadas aos fenótipos mais agressivos de câncer. A expressão de *TPM2* foi maior em tecidos com carcinoma mamário e este resultado foi significativo ($p=0.03$) em tumores com baixa expressão de HER2. O gene *TPM3* foi o único que apresentou expressão estatisticamente maior das pacientes com câncer com o grupo não tumoral ($p=0.01$). Além disso, este gene também apresentou uma expressão 3.34 vezes maior em pacientes com metástase nos linfonodos do que naqueles com onde a metástase era ausente. O gene *TPM4* também apresentou expressão 1.63 vezes maior em pacientes com carcinoma ductal do que as sem a neoplasia, mesmo não sendo significativo. Pacientes com idade superior a 50 anos tiveram a expressão do gene tal *TPM4* maior que as pacientes mais jovens ($p=0.06$), assim como as pacientes que possuíam metástases nos linfonodos ($p=0.84$) o que corrobora com a literatura que associa a idade como fator de risco para o câncer e a presença de metástase nos linfonodos, um indicador de agressividade. A análise de correlação entre os genes e a idade demonstrou que *TPM1* possui relação



inversa à idade (0.83), enquanto *TPM4* possui relação direta ($p=0.07$). A desregulação na expressão gênica das tropomiosinas pode contribuir com a implementação das células dotumor e processo metastático. Os resultados demonstraram que *TPM2*, 3 e 4 possuem expressões aumentadas em relação ao grupo não tumoral, enquanto *TPM1* tem expressão reduzida, podendo indicar o uso destes genes como possíveis biomarcadores do processo carcinogênico.



64. LARGE-SCALE PHENOTYPING TO IDENTIFY GENES OF *Trypanosoma cruzi* RELATED TO DRUG RESISTANCE.

Pacheco-Lugo Lisandro^{1,2}, Sáenz-García José¹, Preti Henrique³, Krieger Marco Aurelio³, Probst Christian³, DaRocha Wanderson¹.

¹Laboratório de Genômica Funcional de Parasitos, Universidade Federal do Paraná.

²Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colômbia.

³Laboratorio de Genômica Funcional, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Paraná.

E-mail: lisandropbiol@gmail.com

The genome of *Trypanosoma cruzi* was published nearly a decade ago, which allowed to understand many of the aspects related to the basic biology of this eukaryote. *T. cruzi* is a non-amenable organism for genetic manipulation due to high genetic diversity, gene copy number variation, and the absence of RNAi machinery rules out the use of high throughput screening methods which has been widely used in *T. brucei*. Then, new approaches are needed to explore gene function in *T. cruzi*, a parasite where 50% of the genes remain without an assigned function. In this work, we report the construction of an overexpression gene library to do phenotyping in large scale gene function in *T. cruzi*. Initially, we optimized the electroporation conditions in epimastigote forms of the parasite, which allowed improving the transfection efficiencies, cell viability, and time of selection of stable parasites when compared with standard transfection protocols. ~3400 open reading frames (ORFs) from the Dm28c cloned into Gateway® platform were pooled based on ORF size making 8 pools that were transferred to a *T. cruzi* expression vector (pTREX) modified for Gateway® cloning strategy and target sequencing. The pools were transfected into *T. cruzi* epimastigotes using our optimized electroporation protocol generating *T. cruzi* overexpression library (TcOvL). As a proof of concept, we evaluated the quality of TcOvL by inducing benznidazole resistance in epimastigotes forms of parasite to identify potential ORFs associated to drug resistance phenotypes. In different times during the protocol, genomic DNA was isolated and PCR amplified to identify differential profiles of ORFs between the control population and parasites submitted to the induction protocol. Some of the specific bands that showed differential intensity were gel purified and Sanger sequenced. This ORFs were individually transfected in epimastigote forms of G strain of *T. cruzi* and selected with G418 for validation, work in progress. This large-scale approach may be used in the future to answer important biological questions of the life cycle of *Trypanosoma cruzi*.

This work is supported by CAPES and CNPq



65. SÍNTESE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA APLICAÇÃO EM CULTURA TRIDIMENSIONAL DE ORGANISMOS UNICELULARES E PLURICELULARES

Lucio de Assis Araujo Neto¹, Beatriz Santos Carvalho², Ivy Garcez Reis³, Gabriela de Oliveira Fernandes⁴, Cíntia Caetano Bonatto³, Vera Lúcia Perussi Polez⁵, Luciano Paulino Silva⁶.

¹Ciências Farmacêuticas, pós-graduação (mestrado), Universidade Federal do Paraná-UFPR

²Nanociência e Nanobiotecnologia, pós-graduação (mestrado), Universidade de Brasília-UnB

³Nanotecnologia, pesquisa aplicada, TecSinapse

⁴Biologia Animal, pós-graduação (doutorado), Universidade de Brasília-UnB;

⁵Biologia Avançada, pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁶Bionanotecnologia, pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

E-mail: lucioaraujo.unb@gmail.com; luciano.paulino@embrapa.br

Introdução: As estratégias para cultura tridimensional (3D) de células foram desenvolvidas com o propósito de mimetizar uma massa de células tecidual, por monocultura ou até mesmo cocultura. Uma técnica que tem recebido destaque crescente, envolve a formação de uma massa celular em 3D por meio da utilização de nanopartículas magnéticas (NPMs) que ao associarem com as células (ou até mesmo organismos microscópicos inteiros), quando expostos a um campo magnético gerado por um ímã, respondem a este formando um aglomerado celular. A utilização dessa tecnologia permite avaliar não somente células eucarióticas, mas também procarióticas e organismos vivos pluricelulares. Sendo assim, o objetivo do estudo foi desenvolver rotas de síntese química de NPMs, avaliar seu potencial citotóxico no fitonematoide *Meloidogyne incognita*, na bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, no fungo filamentosso hialino *Fusarium oxysporum*, em células vermelhas (hemácias) do sangue bovino e também em embriões bovinos, no intuito de avaliar a possível formação de impressão, esferoide e/ou levitação magnética celular para aplicações distintas.

Metodologia: As rotas de síntese de NPMs foram realizadas pelo método de coprecipitação, a partir de moléculas doadoras de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , na presença da base forte hidróxido de sódio (NaOH), formando estruturas magnéticas como magnetita e maghemita, e depois foi adicionada uma molécula orgânica para cobertura destas, possibilitando biocompatibilidade ao nanossistema. Para caracterização das NPMs, foi utilizada a técnica do espalhamento de luz dinâmico (DLS). Para avaliar a citotoxicidade, em uma microplaca de 96 poços foi adicionado o organismo a um volume de 90 μ L. Em seguida, adicionava-se 10 μ L concentrações diferentes de NPMs,



que variavam de 1024 a 2 mM em concentração equivalente de ferro. Aguardava-se overnight e posteriormente a avaliação era realizada ao microscópio de luz. Posteriormente, foram realizados testes de levitação magnética com o *M. incognita*; promoção estruturação de biofilmes após a formação de esferoide com *E. coli* e *F. oxysporum*; ensaio de hemólise com hemácias bovinas; e levitação com embriões bovinos. Para realização desses processos foram utilizados *drivers* baseados em ímãs de neodímio desenvolvidos e comercializados pela empresa Nano3D Biosciences.

Resultados e Discussão: Após o desenvolvimento das rotas de síntese e caracterizações das NPMs, foi observado que estas variavam com relação ao tamanho, Pdl e propriedade magnética. Como as NPMs foram revestidas com moléculas orgânicas e se encontravam biocompatíveis, não foram citotóxicas perante aos organismos citados. Para o fitonematoide *M. incognita* é possível realizar essa abordagem para a sua seleção e purificação dentre outros organismos microscópicos que são encontrados em uma determinada coleta no campo. Para *E. coli* e o fungo *F. oxysporum*, a formação de esferoides celulares constituiu uma alternativa para a promoção de biofilmes os quais puderam ser verificados por meio de microscopia de luz. Com relação às hemácias bovinas, os resultados sugerem que a possibilidade de desenvolvimento de uma nova forma de realizar ensaios de hemólise que seja altamente passível de ser visualizado a olho nu ou com auxílio de um sistema de imageamento. Já os resultados com embriões bovinos indicam a possibilidade de ser desenvolvida uma abordagem inovadora para cultura e maturação *in vitro* de óvulos fecundados para posterior transferência para vacas e outras fêmeas de mamíferos receptoras.

Conclusão: A síntese de NPMs e seu recobrimento formam estruturas biocompatíveis com diferentes organismos. Sendo assim, com o auxílio de um campo magnético gerado pelos *drivers* comerciais, foi possível modular a estrutura de como estes diferentes organismos podem se comportar quando submetidos a um ambiente 3D ao invés de depositarem no fundo das placas. No presente estudo foram demonstradas provas de conceito para formar estruturas como os biofilmes de *E. coli* e *F. oxyporum*, a levitação de embriões bovinos e fitonematoides e também a realização de ensaios de hemólise.

Fontes Financiadoras: Capes, CNPq, FAPDF, Embrapa, Nano3D Biosciences



66. THUYA OCCIDENTALIS 30CH REDUZ CARACTERÍSTICAS TUMORIGÊNICAS E METASTÁTICAS EM MODELO DE MELANOMA MURINO *IN VITRO*

Maria Luiza Ferreira dos Santos, Jenifer Pendiuk Gonçalves, Viviana Stephanie Costa Gagosian e Carolina Camargo de Oliveira.

Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas – Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

E-mail: marialuiza9891@gmail.com; krokoli@ufpr.br

O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo e que surge da transformação maligna dos melanócitos. As células apresentam alto potencial metastático, manipulam o sistema imunológico a seu favor e se camuflam, impossibilitando sua detecção e expulsão. Os tratamentos atuais não são completamente efetivos e causam efeitos colaterais, por isso há a necessidade de novos tratamentos. Compostos naturais altamente diluídos não agredem o organismo e são opções viáveis no tratamento do câncer. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do composto natural altamente diluído *Thuya occidentalis* 30CH (Thuya 30CH), em células de melanoma murino (B16-F10) e em fibroblastos murino (Balb/3T3), com foco em analisar características e funcionalidades das células, além de possíveis ações antimetastáticas e antitumorígenicas nas células tumorais. Para tal, células foram plaqueadas e cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% de Soro Fetal Bovino, penicilina 100U/ml, estreptomicina 100µg/ml, e mantidas a 37°C, 5% CO₂. O composto natural altamente diluído *Thuya occidentalis* 30CH e seu veículo foram manipulados segundo a Farmacopeia Homeopática Brasileira, na Farmácia Homeoterápica de Curitiba e gentilmente cedidos para a realização da pesquisa. As soluções foram esterilizadas por filtração (0,22µm). As células foram tratadas com 20% (v/v) da solução teste ou veículo (água), e com reforço de 1% (v/v) a cada 24h, totalizando 72h de tratamento. Foram analisadas a proliferação celular através do ensaio de cristal violeta e a produção de melanina pelo ensaio de melanogênese. Além disso, foi realizada a marcação com a sonda fluorescente DCFH-DA para detecção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS). A capacidade de retenção de vermelho neutro em vesículas ácidas foi analisada, assim como a atividade mitocondrial através do teste de MTT. A morte celular foi verificada através de citometria de fluxo com os marcadores anexina/7AAD, e o ciclo celular com solução de PI/RNase. Foi analisada por imunomarcagem a molécula de superfície N-caderina, importante para migração e invasão. Além disso, foi realizado o ensaio de formação de colônias utilizando matriz 3D de alginato. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados para cada técnica. Os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade e em seguida ao teste estatístico mais adequado. Thuya 30CH mostrou-se promissor no combate ao melanoma, diminuindo a proliferação em 49%, aumentando a produção de melanina em 35% e a concentração de ROS intracelular em 34%. O tratamento não alterou os parâmetros de funcionalidades testados, e foi observado que não ocorre nenhum tipo de morte celular decorrente do tratamento tanto em células B16-F10 quanto em Balb/3T3, e em



especial para os fibroblastos, não ocorreu alteração na proliferação celular. Houve diferenças significativas nas fases do ciclo, o que pode significar que o tratamento esteja deixando o ciclo mais lento diminuindo em 2% a quantidade de células na fase G2, e aumentando em 3% a quantidade de células na fase S do ciclo celular, e conseqüentemente, diminuindo a proliferação celular de células B16-F10. A expressão de N-caderina foi diminuída 2%, e Thuya 30CH diminuiu o número de colônias formadas em ensaio *in vitro* em 24%, demonstrando promissor potencial antimetastático e antitumoral. Conclui-se que o composto testado é eficaz contra células de melanoma, diminuindo seu poder proliferativo e suas características metastáticas e tumorigênicas, sem alterar a funcionalidade e as características de células não tumorais, como fibroblastos.



67. TGHDAC4: UMA HISTONA DESACETILASE ÚNICA DE APICOMPLEXA

Mariana Sayuri Ishikawa Fragoso, Caroline de Moraes de Siqueira, Priscila Hiraiwa, Vanessa Rossini Severo, Andréa Rodrigues Ávila, Sheila Cristina Nardelli

Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, PR, Brasil.

E-mail: marianaishikawa12@gmail.com

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório, membro do filo Apicomplexa e responsável pela toxoplasmose, doença que afeta um terço da população mundial e para a qual não há cura até o momento. *T. gondii* possui um ciclo de vida complexo, alternando entre dois hospedeiros: os felinos, que são os hospedeiros definitivos, onde ocorre a fase sexuada, e demais animais de sangue quente, entre eles o homem, que são os hospedeiros intermediários e onde ocorre a fase assexuada. Duas formas ocorrem na fase assexuada: os taquizoítas, que são proliferativas e altamente virulentas, e os bradizoítas, que formam cistos que podem permanecer latentes pelo resto da vida do hospedeiro. Durante a diferenciação das formas assexuadas, ocorre um controle refinado da expressão gênica e nosso grupo está interessado em entender a função dos fatores que atuam na regulação epigenética. Nesta regulação, ocorre o controle da expressão gênica sem afetar a sequência do DNA. As modificações pós traducionais de histonas (MPTs) desempenham papel fundamental nessa regulação e uma das enzimas que atua nessa via são as desacetilases de histonas (HDACs), que removem o grupamento acetil das histonas, aumentando a interação entre histonas e DNA, levando ao silenciamento gênico. *Toxoplasma gondii* possui sete desacetilases de histonas, sendo que o foco deste trabalho é a caracterização da TgHDAC4. Inicialmente, foi realizado um resequenciamento de TgHDAC4 a partir do cDNA, uma vez que a porção final do gene estava mal anotado no banco de dados de *Toxoplasma*. A partir da obtenção da sequência completa do gene, foi possível realizar o etiquetamento da proteína endógena, onde foi adicionado uma etiqueta de 3x HA na porção C-terminal de TgHDAC4. Interessantemente, ensaios de imunofluorescência indireta e co-localização, mostraram que TgHDAC4 está localizada no apicoplasto do parasita. Essa organela possui origem endossimbiótica secundária, e é considerada o “calcanhar de Aquiles” de *Toxoplasma*, por se tratar de organela essencial para sua sobrevivência. TgHDAC4 também co-localiza com TgHU, uma proteína histona-like, homóloga à HU de bactérias, que parece estar envolvida na compactação do DNA desta organela. Proteínas de apicoplasto sofrem um processamento durante seu transporte, e o mesmo parece ocorrer com TgHDAC4, pois ensaios de Western blot mostraram uma proteína com cerca de 100 kDa, sendo que seria esperada uma massa molecular de 124 kDa. Adicionalmente, foram realizadas diversas tentativas de nocaute por PCR de fusão e utilizando o sistema CRISPR-Cas9, porém, nunca foram obtidos parasitas com mutação em TgHDAC4, o que sugere que esta enzima possa ser essencial. Nossos dados indicam pela primeira vez a presença de uma desacetilase de histona no apicoplasto de *Toxoplasma*, cuja sequência é única a parasitas do filo Apicomplexa. Entender como essa proteína atua, poderá fornecer novos dados não somente quanto à biologia dessa organela, mas também identificar elementos que atuem no metabolismo essencial ao parasita e futuramente identificar potenciais alvos para o tratamento efetivo da toxoplasmose.

Agências financiadoras: CAPES, CNPQ, Fundação Araucária e ICC/Fiocruz-PR



68. TCTP COMO ALVO TERAPÊUTICO NO TRATAMENTO DO MELANOMA

Marianna Boia Ferreira¹, Alana Beatriz Coelho Basílio¹, Alessandra Emy Hamasaki¹, Fernando Hitomi Matsubara¹, Marcia Helena Appel², Cléber Rafael Vieira Da Costa¹, Luiza Helena Gremski¹, Robert Amson³, Adam Telerman³, Olga Meiri Chaim¹, Silvio Sanches Veiga¹, Andrea Senff-Ribeiro¹.

¹ Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil;

² Departamento de Biologia Estrutural Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, Brasil;

³ Instituto Gustave Roussy, Unité Inserm U981, Bâtiment B2M, Villejuif, França.

E-mail: senffribeiro@ufpr.br

INTRODUÇÃO: A TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) é uma proteína antiapoptótica altamente conservada expressa em diversos organismos e tecidos. Diferentes estudos já estabeleceram seu envolvimento na malignidade, reversão tumoral e apoptose. A expressão de TCTP está aumentada em diferentes tipos tumorais, sendo candidata a marcador tumoral e/ou alvo terapêutico. O silenciamento da TCTP induz o processo de reversão. O processo de reversão tumoral, evento espontâneo, mas raro, é caracterizado por uma reprogramação das células tumorais que retornam a um fenótipo próximo do normal. Além disso, foi demonstrado um antagonismo recíproco entre TCTP e P53. Uma alternativa para reduzir os níveis de TCTP é utilizando a sertralina (SSRI) que ligar-se diretamente na TCTP diminuindo seus níveis proteicos. **METODOLOGIA:** Foram realizados ensaios de viabilidade celular, migração e clonogenicidade utilizando linhagens celulares humanas (A2058 e MeWo) e murinas (B16-F1 e B16-F10) tratadas com sertralina e/ou siRNA *in vitro*. Além disso, o papel da sertralina foi avaliado em ensaios *in vivo* utilizando modelo de melanoma murino C57BL6 e comparando os resultados com a dacarbazina (medicamento de escolha no tratamento clínico do melanoma). Após os tratamentos foram analisados os níveis intracelulares de TCTP e P53. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Células de melanoma humano tratadas com sertralina reduziram os níveis de TCTP tempo e concentração dependente. Além disso, a sertralina é capaz de aumentar os níveis intracelulares de P53, sugerindo que essa alteração possa estar relacionada ao processo de reversão tumoral. Após o tratamento com baixas doses de sertralina (0,01, 0,1 e 1 μ M), as linhagens humanas apresentaram diminuição na viabilidade, do potencial clonogênico, bem como redução na migração celular. Avaliando o papel da TCTP em linhagens de melanoma murino podemos observar que a linhagem B16-F1 (menos metastática) apresenta níveis inferiores de TCTP, além disso a B16-F10 apresenta maior viabilidade, índice proliferativo e potencial migratório se comparado a sua contrapartida B16-F1. Relacionando, dessa forma, os diferentes fenótipos a diferente expressão de TCTP. Além disso, quando foi realizado o silenciamento de TCTP em B16-F10 podemos observar uma redução da viabilidade,



proliferação e migração, sendo o perfil da linhagem silenciada semelhante a B16-F1. Quando a B16-F10 foi tratada com sertralina podemos observar uma redução nos níveis de mRNA e proteína TCTP, bem como uma redução da viabilidade e do potencial clonogênico. Em ensaio *in vivo*, avaliando o uso da sertralina combinada à dacarbazina, podemos observar que a sertralina é capaz de reduzir os níveis de TCTP em biópsias de tumores. Enquanto o tratamento com dacarbazina leva a um aumento de P53 e TCTP, o que pode estar relacionado a resistência desses tumores ao tratamento. Além disso, podemos observar uma redução de Ki67 e aumento de caspase 3 nas biópsias dos animais tratados. Esses resultados corroboram com a literatura que relacionam altos níveis de TCTP e tumores agressivos, além de apontar a TCTP como uma proteína alvo para o estudo da reversão tumoral em linhagens de melanoma. **CONCLUSÃO:** Dessa forma nossos resultados indicam que a TCTP pode ser um alvo no tratamento do melanoma, além de apontarem para utilização promissora de sertralina no melanoma.

Fonte Financiadora: CAPES, CNPq, Fundação Araucária.



69. AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DO TECIDO DE PERICÁRDIO BOVINO SUBMETIDO AO PROCESSO DE DESCELULARIZAÇÃO PARA USO EM BIOPRÓTESES VALVARES

Marina Augusto Heuschkel¹, João Gabriel Roderjan², Paula Hansen Suss², Francisco Diniz Affonso da Costa², Alejandro Correa Dominguez¹, Marco Augusto Stimamiglio¹

¹ Laboratório do Biologia Básica de Células-Tronco, Instituto Carlos Chagas (ICC) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Curitiba – Paraná/Brasil

² Núcleo de Enxertos Cardiovasculares (NEC), Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba – Paraná/Brasil

E-mail: marinaheuschkel@gmail.com

Valvulopatias são doenças que afetam a funcionalidade das válvulas cardíacas. Seu tratamento varia desde medicações, na maioria das vezes paliativas, até intervenções cirúrgicas, que permitem substituir a válvula danificada através de enxertos ou transplantes. No entanto, o número limitado de doadores e as complicações devido à rejeição imunológica faz com que os transplantes sejam impraticáveis para o grande número de pessoas afetadas. Neste contexto, a engenharia de tecidos através dos enxertos cardiovasculares, com o desenvolvimento de valvas cardíacas, tem mostrado ser uma ferramenta de grande potencial para substituir/complementar tais procedimentos. No entanto, as biopróteses convencionais apresentam limitações relacionadas a ruptura e a calcificação. Assim, visando o desenvolvimento de biopróteses valvares, o estudo busca avaliar a descclularização do pericárdio bovino (PB) através de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, procedimento que retira os componentes celulares e mantém a matriz extracelular (MEC). Os tecidos de PB foram descclularizados, utilizando solução de SDS conforme metodologia patenteada (PI 0800603-2). Para o controle de qualidade do processo de descclularização, os pericárdios bovinos descclularizados e nativos (n=9) foram corados com DAPI e HE (Hematoxilina-Eosina) para análise de presença de material nuclear. Além disso, uma porção das amostras foi liofilizada para extração do DNA genômico, através do protocolo de precipitação com acetado de potássio, seguido de eletroforese em gel de agarose. Imunofluorescência foi utilizada para a visualização das proteínas da MEC e do xenoantígeno imunogênico alfa-gal. A citotoxicidade do pericárdio descclularizado foi analisada utilizando o ensaio de contato direto, de acordo com a ISO 10993/5, com células Balb/3T3 cultivadas por 72 horas sobre fragmentos de aproximadamente 3cm² de pericárdio nativo e descclularizado. Após a incubação, as células ao redor do tecido foram analisadas para avaliar seu crescimento em contato com o tecido. Nossos resultados demonstram que o processo de descclularização tecidual promoveu redução média de 77% da quantidade de DNA das amostras. No entanto, houve ausência de núcleos nas colorações de HE e DAPI, apesar da presença de bandas no gel de agarose. O conteúdo e disposição dos colágenos I e III, os maiores constituintes da MEC, não foram alterados, mantendo a sua característica aparência ondulada, sendo o colágeno III mais presente nas áreas mais externas do



tecido. Da mesma maneira, a proteína elastina, principal componente das fibras elásticas manteve-se inalterada e o colágeno IV foi observado apenas no tecido descelularizado, no qual a remoção das células possivelmente deixou as fibras mais expostas e, portanto, visíveis. Porém, decorina e laminina apresentaram marcação reduzida no tecido após a remoção das células nativas (confirmada pela redução na marcação de vimentina). Microscopia eletrônica de varredura revelou um afrouxamento das fibras da face fibrosa do tecido descelularizado em comparação ao tecido fresco. Além disso, observou-se também a ausência de células em toda a superfície tecidual. Os PBs descelularizados permaneceram positivos para alfa-gal e apresentaram-se não-citotóxicos *in vitro*, ao contrário do tecido fresco, com padrões de citotoxicidade leve, ou seja, células com conformação arredondada, frouxamente aderidas e crescimento levemente inibido. Sendo assim, a descelularização branda do PB reduziu o conteúdo de DNA do tecido, manteve as fibras da MEC preservadas, porém removendo proteoglicanos. Além disso, a descelularização mostrou-se não citotóxica. Em conjunto estas características indicam que o tecido pode ser um bom arcabouço para o repovoamento celular e para o desenvolvimento de biopróteses valvares.



70. EFEITO DO POLIMORFISMO RS2279796 (G>A) DO GENE *ABCA7* NOS NÍVEIS DE LIPÍDEOS SÉRICOS DE MULHERES OBESAS

Mayza Dalcin Teixeira¹, Gabrielle Araujo do Nascimento¹, Luciane Viater Tureck², Ricardo Rodrigues Lehtonen de Souza¹, Lupe Furtado-Alle¹.

¹ Laboratório de Polimorfismos e Ligação, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

² Departamento Acadêmico de Ensino (DAENS), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Ponta Grossa.

E-mail: teixeira.mayza@gmail.com

Introdução: A formação das lipoproteínas envolve o transporte não-passivo de lipídeos através das membranas celulares. Diversas proteínas de membrana, que utilizam a energia proveniente da hidrólise do ATP, mediam o transporte destas macromoléculas para dentro e para fora da célula. Neste contexto, a superfamília de transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) é constituída por proteínas de membrana envolvidas no transporte de diversas substâncias. A proteína *ABCA7*, pertencente à esta família, realiza o transporte de fosfolipídeos e colesterol, e está relacionada com a formação de HDL. Polimorfismos no gene *ABCA7* podem afetar o desempenho da proteína resultante e, conseqüentemente, afetar a formação de HDL. Estas falhas, por sua vez, podem levar a diversos distúrbios metabólicos, como dislipidemias, obesidade, e aumentar a susceptibilidade a doenças cardiovasculares. **Metodologia:** O objetivo deste trabalho foi verificar se há influência do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs2279796 (G>A) do gene *ABCA7* sobre os níveis de lipídios séricos de um grupo de mulheres obesas. Para isso, foi coletado sangue de 201 mulheres obesas (índice de massa corporal (IMC) ≥ 30) residentes de Curitiba e região metropolitana para análises bioquímicas (níveis de triglicerídeos – TG, colesterol total – CT, HDL-c, LDL-c e VLDL) e genotípicas, além da mensuração do IMC. As amostras foram genotipadas por ensaio de discriminação alélica TaqMan®. As análises estatísticas envolveram a comparação entre as variáveis agrupadas por genótipo (AA, AG e GG) pelo teste de Mann-Whitney. Para a análise de regressão logística as variáveis dependentes foram transformadas em binárias por meio da categorização em abaixo e acima do valor de sua mediana (zero para valores abaixo e 1 para valores acima da mediana). Genótipo e IMC foram incorporados ao modelo como variáveis independentes. A significância estatística considerada foi de 0,05 (5%). **Resultados e Discussão:** As frequências genotípicas deste polimorfismo apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p= 0,992$). Comparando as variáveis entre os genótipos, as portadoras do genótipo GG apresentaram em média 13,53 mg/dL a mais de CT que as portadoras do genótipo AG ($p= 0,017$) e 22,5 mg/dL a mais que as portadoras do genótipo AA ($p= 0,002$). Da mesma forma, as portadoras do genótipo GG apresentaram, em média, 11,77 mg/dL a mais de LDL-c que as portadoras do genótipo AG ($p= 0,013$) e 20,4 mg/dL a mais que as portadoras do genótipo AA ($p= 0,0002$). Estes resultados sugerem um efeito aditivo entre os alelos A e G, onde as portadoras do genótipo AA possuíam os menores níveis



de CT e LDL-c, as portadoras do genótipo AG possuíam níveis intermediários e as portadoras do genótipo GG apresentaram os maiores níveis. Sendo assim, a adição de cada alelo G ao genótipo está associada com um aumento dos níveis de CT e LDL-c. O teste de regressão logística mostrou que o genótipo GG conferiu um risco de OR= 1,7269 ($p= 0,0329$) vezes maior de que as suas portadoras tivessem níveis de CT maiores que a mediana (185,0 mg/dL) e um risco de OR= 2,1653 ($p= 0,0038$) de que suas portadoras tivessem níveis de LDL-c maiores que a mediana (106,2 mg/dL). O papel da proteína ABCA7 na regulação dos níveis de lipídeos séricos ainda não é bem compreendido. Sua contribuição para o efluxo de lipídeos não parece ser significativa, porém esta proteína pode estar desempenhando seu papel em microambientes de tecidos específicos. Desta forma, são necessários mais estudos sobre a atuação do gene *ABCA7* para explicar este efeito encontrado sobre os níveis de CT e LDL-c nesta amostra de mulheres obesas. Conclusão: O genótipo GG do SNP rs2279796 do gene *ABCA7* parece conferir níveis maiores de colesterol total e LDL-c, comparados com os genótipos AG e AA.

Fonte Financiadora: CAPES



71. ANALYSIS OF CIRCULATING MIRNAS IN SERUM AND CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE, LEWY BODIES DEMENTIA AND PARKINSON'S DISEASE WITH DEMENTIA.

Meire Silva Batistela¹, Carla Daniela Sulzbach¹, Nalini Drieli Josviak¹, Ricardo Krause Martinez de Souza², Sérgio Monteiro de Almeida³, Lupe Furtado-Alle¹, Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza¹.

¹ Department of Genetics, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil.

² Neurology Institute of Curitiba, Curitiba, Brazil.

³ Clinical Hospital of the Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

E-mail: mebatistela@gmail.com

Introduction: Alzheimer's Disease (AD), Lewy Bodies Dementia (LBD) and Parkinson's Disease with Dementia (PDD) are some of the most common causes of neurodegenerative diseases in elderly people and impact directly on the affected individuals and their families. Due to its complex etiology; AD, LBD and PDD often show overlapped symptoms which may complicate clinical diagnosis and, so far, there are no biomarkers capable of establishing the differential diagnosis. Besides its importance in molecular pathways, the circulating miRNAs have been considered as putative biomarkers in prognosis and diagnosis of various diseases, including neurodegenerative ones. Therefore, the present study aims to investigate differentially expressed miRNAs profiles in AD, LBD and PDD by collecting serum and cerebrospinal fluid (CSF), in order to use them as biomarker for differential diagnosis. Methods: fourteen serum and CSF samples of AD, LBD and PDD individuals, 5 serum samples of cognitively normal elderly individuals and 5 CSF samples of patients with Normal Pressure Hydrocephalus (NPH) have been submitted to miRNA-Seq. Serum samples of cognitively normal elderly individuals and the CSF samples of patients with NPH have been assigned as serum and CSF control groups, respectively. All analysis was made by R platform. Results and discussion: differential expression analysis has identified distinct miRNAs profiles for serum and CSF in all dementias compared to control groups, being 7 dysregulated miRNAs in AD, 10 in LBD and 6 in PDD for serum samples; 2 differentially expressed miRNAs in AD, 8 in LBD and 4 in PDD for CSF samples. Enrichment pathways analysis suggests involvement of all miRNAs profiles in molecular mechanisms previously described as dysregulated in neurodegenerative diseases. The miRNAs miR-342-3p and miR-708-5p are differentially expressed in all patient's groups compared to the controls and have been suggested as potential markers of neurodegeneration in the serum. Based on comparison between the patient's groups, the miRNAs miR-125a-5p, miR-380-5p and miR-29b-2-5p have been appointed as potential markers for AD differential diagnosis by serum sampling. Similarly, the miRNAs miR-30c-5p, miR-30d-5p, miR-30e-5p, miR-106b-5p, miR-152-3p and miR-31-5p in serum and miR-423-5p, miR-193b-5p and miR-221-5p in CSF have



been appointed as potential markers for LBD differential diagnosis. Conclusion: despite promising, the miRNAs seen as differentially expressed in this study still need validation with larger cohort and more sensible technique, in order to be possible candidates as biomarker for differential diagnosis of those neurodegenerative dementias.

Financial Support: Grants were received from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).



72. HIGHER FREQUENCY OF THE *APOE* 4 ALLELE AND LOWER BUTYRYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN WOMEN WITH MILD COGNITIVE IMPAIRMENT: POSSIBLE PROGNOSIS MARKERS FOR DEVELOPING ALZHEIMER'S DISEASE

Nalini Drieli Josviak¹, Ricardo Krause Martinez de Souza², Meire Silva Batistela¹, Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza¹, Lupe Furtado-Alle¹

¹ Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

² Neurological Institute of Curitiba (INC), Curitiba, Brazil.

E-mail: drinaly@gmail.com

Introduction. Patients with Mild Cognitive Impairment (MCI) have a higher risk of developing Alzheimer's disease (AD) when compared to normal subjects of the same age. Butyrylcholinesterase (BChE) is an enzyme encoded by *BCHE* gene, capable of hydrolyzing choline esters. K and -116A variants are associated with decrease in plasma BChE activity. *APOE* 4 is considered the greatest risk factor associated with sporadic AD. The aim of this study was to compare the plasma BChE activity between MCI and control group, verifying if their activity is associated with the *BCHE* K, *BCHE* -116A and *APOE* 4 variants. **Methods.** BChE activity was measured using microplate spectrophotometer and all patients and controls were genotyped by TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystem) for K, -116A and *APOE* 4 variants. **Results and discussion.** Only in women, significantly lower mean plasma BChE activity were found in MCI patients when compared to elderly controls, independent of K allele and influenced by -116A variant. A higher frequency of the *APOE* 4 allele in MCI patients was also found. **Conclusion.** These results show that gender, *APOE* 4 and BChE activity are associated with mild cognitive impairment and instigates further study for the possible use of BChE activity in women diagnosed with MCI as a secondary marker for AD progression.



73. COMPARAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA *IN VITRO* ENTRE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATAS SOB INFLUÊNCIA DA TRIIODOTIRONINA

Nathalia Chicon Elert¹, Higor Azevedo Assis¹, Isabella Cosmo da Silva¹, Rogéria Serakides², Natália de Melo Ocarino², Alfredo Miranda de Goes², Francisco de Paula Careta¹, Greiciane Gaburro Paneto¹, Adriana Madeira Alvares da Silva¹, Jankerle Neves Boeloni¹

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES

² Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

E-mail: cosmoisabella1@hotmail.com

Introdução: As células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) são células indiferenciadas que apresentam ampla capacidade de diferenciação, inclusive condrogênica. Estudos prévios compararam o potencial de diferenciação condrogênica das CTM-MO e CTM-TA, como por exemplo em ratos, humanos e cães, porém ainda não existem estudos que comparam o potencial condrogênico das CTM-MO e CTM-TA sob efeito dos hormônios tireoidianos. Assim, o objetivo do presente estudo foi comparar o potencial condrogênico de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas sob efeito da triiodotironina (T3). **Metodologia:** CTM-MO e CTM-TA de ratas Wistar que expressaram CD54, CD73 e CD90 foram cultivadas em meio condrogênico com ou sem T3 e separadas em dez grupos: 1) CTM-MO sem T3; 2) CTM-TA sem T3; 3,4,5,6) CTM-MO com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM, respectivamente) e 7,8,9,10) CTM-TA com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM, respectivamente). Após sete, 14 e 21 dias avaliou-se formação de matriz condrogênica e expressão de Sox9, colágeno II (Col II). Para as análises foram utilizados o teste de Student Newman Keuls ou análise descritiva. **Resultados e Discussão:** Com relação a expressão de Sox9, as CTM-MO apresentaram superioridade em relação as CTM-TA aos sete (doses de 0,01 e 1 nM) e 21 dias (dose de 0,01 nM) de diferenciação. A expressão de Col II foi superior nas CTM-MO somente aos sete dias de diferenciação e na dose de 1 nM. Ao contrário, com relação a formação de matriz condrogênica, as CTM-TA sem tratamento foram superiores em todos os períodos avaliados. Especificamente aos sete dias de diferenciação, as CTM-TA apresentaram formação de matriz superior em relação as CTM-MO, independente da dose hormonal utilizada. As CTM-TA também apresentaram maior formação de matriz aos 14 e 21 dias de diferenciação, porém de forma dose dependente. Acredita-se que esse seja a primeira pesquisa a comparar o potencial de diferenciação condrogênica entre CTM da medula óssea e do tecido adiposo sob influência da T3. E ao contrário dos resultados observados no presente estudo, outros pesquisadores demonstram que as CTM-MO de ratos Sprague-Dawley, de humanos e de cães, todos com variadas idades, apresentaram potencial de diferenciação condrogênica superior ao das CTM-TA. Dessa forma, acredita-se que a diferenciação condrogênica pode ser influenciada pela espécie, linhagem e idade do



doador das CTM e também pela dose hormonal. **Conclusão:** As CTM-TA apresentam maior potencial de diferenciação condrogênica em comparação às CTM-MO sob influência hormonal ou não, uma vez que apresentam maior formação de matriz condrogênica de forma dose e período dependentes.

Fonte financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



74. TRIIODOTIRONINA NÃO INFLUENCIA NA DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA *IN VITRO* DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO DE RATAS

Nathalia Chicon Elert¹, Higor Azevedo Assis¹, Leticia Parmanhani Romao¹, Rogéria Serakides², Natália de Melo Ocarino², Alfredo Miranda de Goes², Francisco de Paula Careta¹, Greiciane Gaburro Paneto¹, Adriana Madeira Alvares da Silva¹, Jankerle Neves Boeloni¹

¹ Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES

² Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG

E-mail: nathalia.elert@hotmail.com

Introdução: As células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) apresentam ampla capacidade de diferenciação, inclusive condrogênica. Especificamente sobre a diferenciação condrogênica, já existem protocolos bem definidos. No entanto, muitos fatores e mecanismos ainda precisam ser elucidados. Nesse contexto, ainda não existem estudos verificando o efeito dos hormônios tireoidianos sobre o potencial condrogênico das CTM-TA. O que se sabe é que essas CTM-TA apresentam receptores para hormônios tireoidianos. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito *in vitro* da triiodotironina (T3) na diferenciação condrogênica de CTM-TA de ratas, durante vários períodos e em várias doses. **Metodologia:** CTM-TA de ratas Wistar que expressaram CD54, CD73 e CD90 e que apresentaram viabilidade celular superior a 90% foram cultivadas em meio condrogênico com ou sem T3 e separadas em cinco grupos: 1) CTM-TA sem T3; e 2,3,4,5) CTM-TA com T3 (0,01; 1; 100 e 1000 nM, respectivamente). Aos sete, 14 e 21 dias avaliou-se morfologia celular, formação de matriz condrogênica e expressão de Sox9, colágeno II (Col II) e somente aos 21 dias de diferenciação avaliou-se expressão de colágeno X (Col X). Para as análises foram utilizados o teste de Student Newman Keuls ou o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn. **Resultados e Discussão:** Somente a dose de 1000 nM induziu hipertrofia precoce em CTM-TA e essa característica se manteve em todos os grupos aos 14 e 21 dias de diferenciação. A T3 não alterou a formação de matriz condrogênica e a expressão de Col II e X em nenhum dos períodos avaliados. No entanto, as doses de 0,01; 1 e 1000 nM T3 diminuíram a expressão de Sox9 aos sete dias de diferenciação, a dose de 1 nM T3 aumentou essa expressão de Sox9 aos 14 dias e aos 21 dias não houve alteração nessa expressão. Outros estudos demonstram no início da diferenciação condrogênica as células apresentam uma morfologia fibroblastoide e somente ao longo desse processo *in vitro* sofrem hipertrofia, diferentemente do que foi observado no presente estudo. Pesquisas anteriores da equipe que compõem esse trabalho verificaram que T3 tem efeito dose-dependente sobre a diferenciação condrogênica das CTM da medula óssea de ratas por aumentar a formação de matriz condrogênica e a expressão de Sox9 e Col II. Estudos comprovam ainda que o tratamento hormonal (T4) não altera a expressão de Col II em condrócitos humanos aos 21 dias de cultivo. Col II é expresso ao longo da



diferenciação condrogênica e à medida que as células se diferenciam em condrócitos hipertróficos, sua expressão diminui enquanto aumenta a expressão de Col X. Assim, pode-se inferir que a formação de matriz condrogênica e a expressão gênica pode variar de acordo com a dose hormonal, com o tipo e grau de maturação celular e com a espécie doadora das células. **Conclusão:** A T3 não altera a diferenciação condrogênica de CTM-TA, uma vez que induz hipertrofia precoce, diminui a expressão de Sox9 de forma dose dependente, mas não altera a expressão de Col II, Col X e a formação de matriz condrogênica.

Fonte financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



75. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MIR-9 EM SORO DE PACIENTES COM DOENÇA DE ALZHEIMER

Nicoli Ramos Wegner, Meire Silva Batistela, Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, Lupe Furtado-Alle.

Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

E-mail: mebatistela@gmail.com

Introdução: a Doença de Alzheimer (DA) é o tipo de demência mais comum na população senil e é responsável por mais da metade dos casos de neurodegeneração nessa faixa etária. Os indivíduos com essa patologia apresentam prejuízos principalmente nas funções cognitivas, sendo a memória a mais afetada. Na clínica os fármacos utilizados são direcionados apenas aos sintomas, uma vez que, até o momento, não existem medicamentos capazes de impedir a progressão da doença (morte neuronal), o que se deve, em parte, aos mecanismos moleculares ainda não totalmente compreendidos. Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs (~22nt) não codificadores capazes de regular a expressão gênica pós transcricionalmente. Os miRNAs já foram descritos como desempenhando papéis importantes em vias do envelhecimento cerebral, desenvolvimento neuronal e também estão relacionados às doenças neurodegenerativas, entre elas, a DA. Estes pequenos RNAs são estáveis em fluidos como soro, líquido cefalorraquiano e saliva e suas concentrações normalmente estão alteradas na presença de processos patológicos. O miR-9 está relacionado a importantes vias como a da neurogênese e diferenciação celular e já foi descrito como diferencialmente expresso em cérebro de pacientes com DA. O objetivo deste trabalho é analisar a expressão do miR-9 em soro de pacientes com DA comparado a controles idosos cognitivamente saudáveis. **Materiais e métodos:** foram utilizados 50 indivíduos, 39 pacientes com DA e 11 controles. Os miRNAs presentes nas amostras foram isolados com auxílio do kit mirVana™ PARIS™, retrotranscritos e quantificados por RT-qPCR (TaqMan® MicroRNA Assays (*Applied Biosystems*)). O *Fold Change* (FC) foi calculado para cada uma das amostras pelo método do $\Delta\Delta CT$, utilizando o miR-16 como controle endógeno, e os valores foram comparados entre os grupos caso e controle pelo teste Wilcoxon rank sum. Também foi realizada a predição de alvos do miR-9 com auxílio do pacote multiMiR da plataforma R. **Resultados e discussão:** a partir das análises de expressão diferencial, verificou-se que o miR-9 está significativamente mais expresso em soro de pacientes com DA quando comparado ao grupo controle ($p=0,004406$). A predição dos alvos apontou os genes *BACE1*, *REST* e *NF-kB* como os principais genes que poderiam estar sofrendo regulação pelo miR-9. De forma geral, todos estes genes já foram relacionados à neuroinflamação e neurodegeneração. Mais especificamente, o gene *BACE1* atua regulando a formação dos peptídeos β -amilóides, acumulados no cérebro de pacientes com DA. **Conclusões:** uma vez que os miRNAs são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, a alta expressão do miR-9 encontrada no soro pode ser efeito da desregulação dos



processos patogênicos que ocorrem no cérebro, em que este miRNA pode estar atuando.



76. INVESTIGAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS DE TRANSPOSIÇÃO NO GENOMA DE *Schistosoma japonicum*

Pâmela Silva de Oliveira ^{1,2}, Sinara Santos Jardim ², Marícia Fantinel D'Ávila ², Daniel Ângelo Sganzerla Graichen ²

¹ Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Palmeira das Missões – RS – Brasil.

² Laboratório de Genética Evolutiva, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Palmeira das Missões – RS – Brasil.

E-mail: pamela.s.oliveira@hotmail.com

As principais linhagens parasitárias do filo Platyhelminthes, têm sido amplamente estudados durante décadas, principalmente pelo fato de que questões importantes sobre a relação parasita/hospedeiro serem mal resolvidas. Atualmente, vários genomas de platelmintos tornaram-se disponíveis fornecendo base para análises genômicas comparativas, possibilitando a identificação de adaptações evolutivas específicas do estilo de vida dos parasitos. Além disso, sabe-se que, uma grande porção dos genomas de platelmintos é composta por Elementos Transponíveis (TEs), que são sequências de DNA com capacidade de mover-se no genoma. Uma das consequências biológicas da mobilização dos TEs é criar novidades evolutivas, fonte de evolução adaptativa. O genoma de *Schistosoma japonicum*, platelminto com relevância médica, contém 65% do genoma composto por sequências repetitivas, incluindo TEs. Assim, o objetivo desta pesquisa é caracterizar o mobiloma de *S. japonicum* e analisar a Transferência Horizontal dentro do filo Platyhelminthes e entre parasita/hospedeiro. Para obter informações da composição dos TEs do genoma, realizamos uma análise no genoma de *S. japonicum* utilizando um *pipeline* computacional do *RepeatExplorer*, da plataforma *Galaxy*. As sequências genômicas analisadas foram compostas por 187.326 *reads*. Desses *reads*, 159.074 foram agrupados em 17.282 *clusters*, onde 490 *clusters* foram mais representativos e abrangendo 50% do genoma. Analisando os *clusters* representativos, encontramos um conjunto de elementos altamente repetitivos, incluindo TEs. Os TEs, encontrados foram transposons e retrotransposons LTR e non-LTR. As principais famílias de transposons encontradas foram Maverick (0,000196% do genoma), Helitron (0,000526%) e hAT-Tip100 (0,0009%). Encontramos também famílias de retrotransposons LTR, Gypsy (1,82%) e Pao (0,125%), e non-LTR, RTE-BovB (5.6%), L2 (0,000316%) e CR1(0,000517%). Surpreendentemente, encontrou-se uma grande proporção da família RTE-BovB, que é amplamente distribuída em vertebrados como *Bos taurus* (gado bovino), *Equus caballus* (cavalo) e *Vipera ammodytes* (víbora-cornuda). É importante resaltar que alguns elementos de transposição dessa família têm alto potencial de transferência horizontal entre genomas de espécies não relacionadas. Além disso, o *Schistosoma japonicum* tem como hospedeiro intermediário diferentes espécies de mamíferos entre eles o gado bovino. Portanto, a partir das informações sobre as famílias de TE coletadas até agora no genoma de *S. japonicum* será possível



comparar quais são os elementos compartilhados entre a espécie e outros platelmintos do filo, e analisar um possível caso de transferência horizontal entre o organismo e seus hospedeiros.



77. EXPRESSION OF BCL-6 AND ITS ROLE IN NOTCH SIGNALING

Paola Gyuliane Goncalves, Yukiko Kitagawa, Nadia Carlesso.

HB Wells Center for Pediatric Research, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is one of the most common cancers in children. Although the development of multiagent chemotherapy improved the survival rate for children with ALL, 10-20% of patients are predicted to relapse and the treatment for relapsed patients is still challenging. Notch and B-cell/lymphoma 6 (BCL-6) function as transcriptional factors. Notch1 plays roles in T cell lineage development, thymocyte survival, and proliferation of T-cell progenitors, while BCL-6 controls B cell activation, differentiation and apoptosis during the Germinal Center (GC) reaction. Aberrant Notch1 function is associated with leukemogenesis in T-ALL, while BCL-6 is an oncogene in GC-derived lymphomas. Previously we found that Notch/RBPJ functions as a transcriptional repressor of microRNA-155 (miR-155) expression. As BCL-6 is known to be regulated by miR-155, and BCL-6 is one of the predicted Notch1 target genes, it leads us to hypothesize if BCL-6 expression is regulated by Notch. First, we checked BCL-6 expression in various T-ALL cell lines. As results, we found that the BCL-6 is expressed in 4 different T-ALL cell lines and the relative expression of BCL-6 is similar to Hes-1 expression in those cell lines. Further, cells stimulated by Notch signaling with Delta-like ligand 4 (DLL4) showed 2-fold-increase of BCL-6 compared to cells without DLL4 stimulation. Moreover, as we found a putative RBPJ binding sequence in BCL-6 promoter region, we performed the Chromatin immunoprecipitation assay, and it showed that RBPJ binds to BCL-6 promoter in cells with DLL4 stimulation. In conclusion, our results strongly suggest that Notch signaling regulates BCL-6 expression through RBPJ binding to BCL-6 promoter. As BCL-6 represses the expression of many of its target genes, our results might provide a new therapeutic strategies targeting BCL-6 in T-ALL treatment. Now, we are checking the involvement of miR-155 in BCL-6 regulation by Notch signaling.



78. INVESTIGAÇÃO DE COMPONENTES ESPECÍFICOS E ESSENCIAIS PARA EXPORTAÇÃO DE MRNA DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Patricia Ferreira Domingues¹, Alexandre Haruo Inoue¹, Newton Medeiros Vidal², Samuel Goldenberg¹, Mark C. Field³, Andréa Rodrigues Ávila¹

¹ Instituto Carlos Chagas, ICC, FIOCRUZ, Curitiba, PR, Brazil

² National Center for Biotechnology Information, NCBI, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD, United States of America

³ Wellcome Trust Centre for Anti-Infectives Research, School of Life Sciences, University of Dundee, Dow Street, Dundee, DD1 5EH, UK.

E-mail: aravila@fiocruz.br

Durante a evolução, *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, e outros parasitas da família Trypanosomatidae desenvolveram características distintas de outros eucariotos em relação à sua biologia molecular. Nessas células, devido à quase ausência de regiões promotoras no genoma, os eventos pós-transcricionais se tornam pontos majoritários no controle da expressão gênica, nos quais estão envolvidos fatores às vezes únicos. Apesar de crucial para a homeostasia em outros eucariotos, a exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma é pouco compreendida nesses parasitas. Sabe-se, até o momento, que a maioria das proteínas envolvidas nesse transporte em outros eucariotos não está conservada em diversas espécies de parasitas, com exceção da proteína de mamífero UAP56 (Sub2, em levedura). Em *T. cruzi*, a ortóloga é a proteína TcSub2 que se mostrou essencial para sobrevivência do parasita e para a exportação de mRNA. Abordagens de proteômica utilizando como alvo TcSub2 permitiu a identificação de fatores associados com função ainda desconhecida e que são conservados apenas entre espécies de tripanossomatídeos. Dentre elas, duas proteínas hipotéticas, cujas análises *in silico* apresentaram domínios conservados, foram denominadas como TcFOP-like e TcAPI5-like. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação desses fatores com TcSub2 e seu papel na exportação de mRNA em *T. cruzi*. TcFOP-like apresentou um domínio FOP, o qual é caracterizado por possuir um UBM – **Uap56/Sub2 Binding Motif**. E TcAPI5-like apresentou um domínio API5 (*Apoptosis Inhibitory 5*). Aqui, nós confirmamos que TcFOP-like e TcAPI5-like são proteínas nucleares e colocalizam com TcSub2. A partir dos ensaios de imunoprecipitação usando como alvo TcFOP-like e TcAPI5-like podemos inferir que ambas as proteínas interagem com TcSub2, sendo que esta interação no caso de TcFOP-like é via domínio FOP. A superexpressão de TcFOP-like altera significativamente a cinética de crescimento da cultura, alterando a progressão do ciclo celular, visto o aumento na percentagem de células na fase G2/M. Além disso, ensaios de imunoprecipitação usando como alvo outras proteínas envolvidas na via de exportação de mRNA como o receptor de transporte TcMex67 e a RNA helicase TcHel45, mostra que TcFOP-like estaria de algum modo interagindo com estas



proteínas. Estas evidências sustentam a ideia da presença de componentes divergentes na via de exportação de mRNA em tripanossomatídeos.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*. Exportação de mRNA. TcSub2.TcFOP-like. TcAPI5-like.



79. IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ELEMENTOS DA VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG EM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO: UMA VISÃO PÓS-TRANSCRICIONAL

Patrícia Shigunov¹, Lucas Tilton Balvedi¹, Bruna Cristina Falavinha¹, Roberto Hirochi Herai², Bruno Dallagiovanna¹

¹ Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ –PR

² Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC-PR

E-mail: patricia.shigunov@fiocruz.br

Células-tronco mesenquimais (CTMs) tem capacidade de diferenciar em linhagens mesodermas. Os processos biológicos responsáveis pela diferenciação de CT não são completamente entendidos, afetando o desenvolvimento de novas terapias celulares. Diferentes vias de sinalização celular estão envolvidas no controle da proliferação e no comprometimento das CT em diferentes linhagens celulares. Dentre estas, a via de sinalização Hedgehog (Hh) tem sido alvo recente de pesquisa na área. A via de sinalização Hh tem função em muitos processos durante o desenvolvimento embrionário e permanece ativa durante a fase adulta. Essa via está relacionada com a proliferação celular, diferenciação, angiogênese, remodelamento da matriz celular e homeostase de CT. A via Hh tem sido caracterizada como um intensificador da osteogênese e condrogênese em CT adultas, e a identificação de novos elementos da via poderá auxiliar no desenvolvimento de terapias para potencializar a formação de osso, cartilagem e adipócitos. Os mRNAs associados a polissomos representam com maior fidelidade o conjunto de proteínas expressas na célula e as mudanças associadas ao processo de diferenciação comparado ao transcriptoma. Nesta perspectiva, uma técnica conhecida como *polysome profiling* foi realizada, a qual consiste na separação dos mRNAs que se encontram associados aos ribossomos, através de um gradiente de sacarose. A partir dessa técnica, o objetivo central do projeto foi identificar os mRNAs polissomais das CT em resposta a ativação e bloqueio da via Hh, determinar as redes gênicas e selecionar genes candidatos para estudos funcionais. Utilizamos para este fim CT de tecido adiposo (CTA), moléculas ativadoras e inibidoras da via Hh (Pur morfamina e ciclopamina) e a técnica de Polysome Profile associado ao sequenciamento de última geração (RNA-Seq) para identificar os mRNAs regulados. Identificamos 272 e 313 genes (p-value $\leq 0,05$) nas amostras da fração polissomal tratada com pur morfamina e ciclopamina, sendo 125 e 96 genes diferencialmente representados ($\log FC \geq \pm 1,5$), respectivamente em relação ao controle tratado com DMSO. A quantidade do mRNA do receptor da interleucina 21 (*IL21R*) diminuiu na fração polissomal com a ativação da via Hh e aumentou com o bloqueio da mesma. A quantidade do mRNA do *IL21R* também diminuiu com a diferenciação celular para adipócitos. Poucos dados permitem relacionar o gene *IL21R* com células-tronco adultas e a via de sinalização Hh, tornando-o um gene candidato para estudos funcionais. A caracterização desse gene será realizada por RNAi e vetores de expressão durante a proliferação, diferenciação e resposta da via Hh.



80. DESENVOLVIMENTO DE QPCR DUPLEX PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* spp. USANDO REAGENTES NACIONAIS

Paulo Alexandre Silveira da Silva¹, Rita de Cássia Pontello Rampazzo¹, Daniel Moreira de Avelar³, Marco Aurelio Krieger^{1 2}, Alexandre Dias Tavares Costa^{1 2}

¹Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), Curitiba, Brasil

²Instituto Carlos Chagas (ICC), Curitiba, Brasil

³Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), Belo Horizonte, Brasil

E-mail: pauloas@ibmp.org.br

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada por parasitas do gênero *Leishmania*, podendo ser do tipo tegumentar (cutânea), visceral, cutânea – mucosa e difusa, dependendo da espécie do parasita. É uma antroponose, acometendo tanto animais quanto humanos. Apesar de ser infecciosa, a doença não é considerada contagiosa, pois necessita de um vetor para a ocorrência da transmissão. O vetor é um inseto hematófago dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, conhecido popularmente como mosquito palha, típico da zona tropical. Segundo dados da OMS de 2013, cerca de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas e mais de 1 milhão de pessoas adquirem leishmaniose, sendo a taxa de mortalidade causada pela leishmaniose visceral a mais elevada, sendo considerada uma doença tropical negligenciada. Atualmente existem vários métodos de detecção da patologia, como por exemplo testes de microscopia, cultura celular, sorológicos por Elisa direto e indireto, além de molecular por PCR (reação em cadeia da polimerase). Cada método possui sua limitação, como por exemplo não ter aplicação para detecção de todas as espécies de *Leishmania*, ou possuir índices elevados de reações cruzadas com outros agentes etiológicos, ou não diferenciar células vivas ou mortas. Assim, é importante o desenvolvimento de um teste de detecção simples e eficiente, mas que seja específico e sensível. Para o desenvolvimento de uma nova qPCR, usando reagentes produzidos no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP/Fiocruz PR), usamos uma sequência específica do gene da subunidade menor do RNA ribossomal 16S escolhido por ser multicópia e ser uma região conservada dentro do gênero *Leishmania*. O teste em desenvolvimento possui uma especificidade no gênero do parasita e não em uma espécie. Foram testadas amostras de DNA de quatro espécies: *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. infantum chagasi*. O DNA do parasita foi diluído em DNA de sangue humano negativo para leishmaniose. A reação padronizada registrou um limite de detecção de 1fg de DNA, que é equivalente a 1 genoma do parasita. Estes resultados representam um ganho de sensibilidade de 10x para *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em relação aos resultados anteriores, obtidos usando reagentes importados. Para a detecção de *L. guyanensis* não houve ganho de



sensibilidade. Atualmente, a reação está em processo de padronização na plataforma portátil de qPCR chamada Q3. Sendo um equipamento portátil, relativamente barato, de fácil uso, e que pode ser instalado e operado em qualquer computador sem a necessidade de um especialista para o manuseio, o Q3 pode ser um equipamento importante para uso em locais de infraestrutura que não permita a operação de instrumentos delicados como o ABI7500. Os resultados preliminares indicam que o Q3 possui sensibilidade idêntica à obtida no ABI7500 para todas as espécies estudadas. Estes resultados podem melhorar o gerenciamento de infecções, tanto humanas quanto animais, em regiões de difícil acesso aos métodos mais sensíveis (e caros) de diagnóstico, auxiliando no controle e vigilância epidemiológica da leishmaniose.



81. CARACTERIZAÇÃO DO RNA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA SEPSE

Paulo Szwarc^{1,2}, Lysangela Ronalte Alves², Lucy Ono¹

¹ Universidade Federal do Paraná

² Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ –PR

E-mail: pauloszwarc@gmail.com

A sepse é uma disfunção de órgãos sistêmica com elevado risco de morte, provocada pela resposta inflamatória desregulada durante uma infecção. Esta doença gera um peso social elevado, por ser a principal causa de morte em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva. Além disso, os gastos necessários para o gerenciamento e tratamento dos pacientes com sepse, a maioria idosos, sobrecarregam o orçamento hospitalar. Os mecanismos patológicos da enfermidade ainda não são completamente compreendidos, onde o tratamento disponível tenta suprimir a inflamação sistêmica e eliminar a infecção, com sendo insuficiente em muitos casos. Novos tratamentos e métodos de diagnóstico são necessários, para a redução das taxas de mortalidade relacionadas à sepse. As vesículas extracelulares (EVs) são partículas esféricas de membrana biológica produzidas e secretadas por quase todos os tipos celulares. Sua importância foi elevada após a descoberta da sua função como veículo de transporte de moléculas, estando envolvido na comunicação intra e inter-espécie. A associação de moléculas de RNA às EVs, como microRNAs, possibilita a célula secretora utilizar esse mecanismo para regular e modular as células receptoras das EVs. Além disso, existem evidências que o RNA associado as EVs pode ser utilizado como biomarcador de certas doenças. Os estudos relacionando as EVs à sepse ainda são relativamente escassos, portanto a investigação da influência desse mecanismo de comunicação celular pode trazer novas informações acerca da fisiopatologia da sepse. Isso abrirá caminhos para possíveis terapias e novos biomarcadores para diagnóstico. Este projeto visa sequenciar o conteúdo de RNA associado às EVs isoladas do sangue de pacientes com sepse e compara-lo com o de amostras de indivíduos saudáveis e com uma infecção viral (Dengue). As amostras de sangue foram obtidas de pacientes com sepse do Hospital de Clínicas/UFPR. O isolamento das EVs e do RNA será realizado por meio de kits comerciais, e o sequenciamento do RNA será realizado com o equipamento Illumina. As sequências obtidas serão alinhadas em bases de dados para identificação de possíveis moléculas de RNA com função regulatória e viáveis para uso como biomarcadores na sepse.

Fonte financiadora: Fundação Araucária/PIBIC ICC



82.INTERAÇÕES PROTEICAS DA QSOX RECOMBINANTE EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA

Pierina Martínez Huamaní, Lia Sumie Nakao

Laboratório Patologia – REDOX, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – Brasil

E-mail: pierinamh18@gmail.com

INTRODUÇÃO: Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) é uma flavoproteína predominantemente secretada cuja função biológica é pouco compreendida. Por ser extracelular, foi demonstrado que pode atuar na organização dos trimeros de laminina, modular a adesão e a migração de células tumorais e de fibroblastos. Nosso grupo recentemente mostrou que QSOX1 extracelular estimula a proliferação e a migração de células musculares lisas de aorta (VSMC) de rato. Essa proliferação independe da atividade sulfidril oxidase, diferentemente da migração, que só ocorre na presença da QSOX1 ativa. A hipótese é que a QSOX1 extracelular se liga a uma proteína na superfície celular e desencadeia estes dois processos. Neste projeto, pretende-se identificar proteínas ligantes da QSOX1, principalmente aquelas localizadas na superfície das VSMC. **METODOLOGIA:** Foi padronizado um ensaio de cross-linking com formaldeído para estabilizar os complexos de QSOX1 recombinante com seus possíveis ligantes nas VSMC. As amostras foram posteriormente analisadas por SDS-PAGE e coloração com nitrato de prata. Além disso, em VSMC incubadas com QSOX recombinante, foi feita uma imunomarcagem com anticorpo anti-QSOX para avaliar se a recombinante se liga na superfície celular; o ensaio foi feito tanto em células aderidas como em células em suspensão. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Nas corridas eletroforéticas do ensaio de cross-linking, foram observadas bandas diferentes somente nas amostras de células incubadas com 250 e 500 nM de QSOX recombinante por 5 e 15 minutos, que poderiam ser de proteínas ligantes desta. O ensaio ainda será repetido para confirmação dos resultados e para a inclusão de mais controles. As imagens de imunofluorescência obtidas no microscópio confocal mostram uma marcação intensa nos espaços intercelulares, sendo possivelmente uma ligação da QSOX recombinante às proteínas de matriz extracelular. Porém mais importante foi a observação de uma marcação nas bordas das células incubadas com 500 e 1000 nM de QSOX recombinante. O indicio que essa marcação é na membrana celular é reforçada quando a visão ortogonal é analisada. Essa marcação também foi observada quando o ensaio foi realizado com células em suspensão, indicando que existe uma interação da QSOX recombinante com a membrana da célula. **CONCLUSÃO:** Apesar de preliminares, nossos resultados evidenciam a interação de QSOX recombinante com proteínas de VSMC, possivelmente localizadas na membrana plasmática. Ensaio futuros vão permitir elucidar a especificidade dessas interações e identificar essas proteínas ligantes.



83. EFFECTS OF HEAT STRESS ON THE RENAL AND BRANCHIAL CARBOHYDRATE METABOLISM AND ANTIOXIDANT SYSTEM OF ANTARCTIC FISH

Priscila Krebsbach Kandalski, Mariana Forgati, Tatiana Herrerias, Tania Zaleski, Cintia Machado, Maria Rosa Dmengenon Pedreiro de Souza, Lucélia Donatti

Adaptive Biology Laboratory, Department of Cell Biology, Federal University of Parana, Curitiba, Paraná, Brazil

E-mail: donatti@ufpr.br

Antarctic fishes are considered extremely stenothermal animals, experiencing temperatures close to the freezing point of ocean water (-1.9°C) and annual temperature fluctuations smaller than 1°C. The inability of some Antarctic fish species to acclimate to high temperatures is somewhat worrisome when analyzing global warming trends. The adjacent ocean surface waters have undergone considerable warming, with an increase in the average temperature of 1°C over the last 60 years. Thus, the objective of the present study was to assess the effect of short-term (2-144 h) heat stress (8°C) on energy production processes and antioxidant defense systems in the kidneys and gills of *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* from Admiralty Bay, King George Island, Antarctic Peninsula. We measured activities of enzymes involved: in carbohydrate metabolism, like as hexokinase (HK), phosphofrutokinase (PFK), citrate synthase (CS), malate dehydrogenase (MDH), lactate dehydrogenase (LDH) and glucose-6-phosphatase (G6Pase); and, in antioxidant defense, like as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). As well as concentrations of intermediary metabolites (glycogen, lactate and pyruvate) and oxidative damage markers, such as lipid peroxidation (LPO) and carbonylated proteins (CP). Heat stress affected energy metabolism and oxidative stress parameters in a time-, tissue- and species-dependent manner, and gills were more sensitive than kidneys to heat stress. *N. rossii* kidneys were able to stabilize carbohydrate metabolism after 12 h of heat stress, whereas the glycogen levels in *N. coriiceps* kidneys fluctuated in response to varying G6Pase levels. The gills of *N. rossii* were able to stabilize their energy demand and aerobic metabolism under heat stress, whereas in the gills of *N. coriiceps*, changes in carbohydrate metabolic pathways depended on the exposure time: initially, anaerobiosis was activated after 6 h; the energy demand, characterized by glycogen consumption, increased after 72 h, and aerobic metabolism was activated within 144 h. With regard to the antioxidant defenses of the *N. rossii* kidney, it was found that levels of antioxidant enzymes were reduced during the first hours of heat stress, contributing to increased lipid peroxidation (LPO), whereas *N. coriiceps* kidneys did not show signs of oxidative damage. The gills of *N. rossii* exhibited more pronounced oxidative damage in response to heat stress than those of *N. coriiceps* despite the presence of increasing levels of antioxidants, likely due to tissue hypoxia. Thus, the results suggest that although *N. rossii* and *N. coriiceps*



kidneys were able to stabilize the energy demand and maintain aerobic metabolism under heat stress, the gills of both species underwent, at least at some point, temperature-induced hypoxia. *N. coriiceps* exhibited increased energy demand and reversed the hypoxic conditions by activating aerobic metabolism after 72 h of exposure to 8°C. Thus, the kidneys and gills of *N. coriiceps* did not suffer oxidative damage in response to heat stress, likely due to the efficiency of its antioxidant system. In *N. rossii*, high rates of LPO were observed, particularly in the gills, which was likely a response to temperature-induced hypoxia in this organ.



84. EFFECT OF LONG-TERM THERMAL STRESS ON ANTARCTIC NOTOTHENIID *Notothenia rossii* JUVENILES

Priscila Krebsbach Kandalski¹, Tania Zaleski¹, Mariana Forgati¹, Flávia Baduy^{1,2}, Danilo Santos Eugênio¹, Cintia Machado¹, Maria Rosa Dmengen Pedreiro de Souza¹, Cláudio Adriano Piechnik¹, Lucélia Donatti¹

¹ Adaptive Biology Laboratory, Department of Cell Biology, Federal University of Parana, Curitiba, Paraná, Brazil

² Comparative Endocrinology and Integrative Biology, CCMar, University of Algarve, Faro, Portugal.

E-mail: donatti@ufpr.br

The thermal stability of the Antarctic Ocean raises questions concerning the metabolic plasticity of Antarctic nototheniids to temperature variations, such as those found in Admiralty Bay, King George Island, Antarctic Peninsula. Thus, the long-term effects caused by a temperature increase on energy metabolism, antioxidant defense markers, plasma parameters and well-being indices were analyzed in *Notothenia rossii* juveniles. *Notothenia rossii* juveniles survived 90 days at a temperature of 8 °C, and their level of well-being was maintained; however, the gonad and hepatosomatic indices of the animals decreased, indicating a decrease in nutrient storage as a result of changes in energy demands to support survival. In these animals, plasma calcium, magnesium, cholesterol and triglyceride concentrations decreased at 8°C, whereas glucose and albumin concentrations increased. Long-term exposure to a temperature of 8°C also triggered a change in the main energy substrate from lipids to glucose in the *N. rossii* juveniles due to the high consumption of lipids. The increase in the malate dehydrogenase (MDH) and lactate dehydrogenase (LDH) activities increased in all tissues except the gills, suggesting enhanced gluconeogenesis in fish acclimated to a temperature of 8°C. Higher temperature induced a significant increase of citrate synthase (CS) activity, indicating an increase in aerobic demand in liver, while in the other tissues it was inhibited. There was a decrease in the activity of enzymes related to antioxidant defenses to levels that were most likely sufficient at 8°C, thereby establishing a new physiological activity range against reactive oxygen species (ROS). Our findings indicate that *N. rossii* juveniles were able to survive and that the species has compensatory mechanisms that enabled the long-term survival of individuals at a temperature of 8°C.



85. ESTUDOS DE LOCALIZAÇÃO DE MIOSINAS DE *Trypanosoma cruzi*.

Rafael Benedetti¹, Denise Andréa Silva de Souza², Yasmin Carla Ribeiro³, Daniela Parada Pavoni^{2,3}.

¹ Acadêmico de Biomedicina pela Universidade Tuiuti do Paraná

² Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia ICC/FIOCRUZ-PR

³ Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular/UFPR

E-mail: daniela.pavoni@fiocruz.com

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado causador da doença de Chagas. As miosinas compõem o grupo das proteínas motoras e possuem duas regiões: a cabeça, porção N-terminal responsável por hidrolisar ATP e ligar-se à actina, e a cauda, porção C-terminal, responsável por se ligar à carga a ser transportada. A divergência de função da porção C-terminal de *T. cruzi* para a miosina humana está atrelada ao fato do parasita possuir somente miosinas não convencionais. Na análise do sequenciamento do genoma de *Trypanosoma cruzi*, percebeu-se que este parasita possuía genes codificadores de nove miosinas: TcMyo1, TcMyo13, TcMyoA, TcMyoB, TcMyoC, TcMyoD, TcMyoE, TcMyoF e TcMyoG. Objetivando esclarecer a função destas miosinas em *T. cruzi*, iniciou-se um trabalho de caracterização proteica, através de ensaios de localização celular. Em projetos anteriores do grupo, foram realizados ensaios visando a localização celular das miosinas usando duas estratégias: A) produção de antissoros para serem utilizados em ensaios de imunofluorescência e B) produção de miosinas fusionadas à proteína fluorescente verde- GFP. Os resultados não foram conclusivos, já que proteínas recombinantes podem ter sua localização alterada em função da etiqueta. Os antissoros não se mostraram tão específicos e o sinal observado nos imunoenaios poderia refletir a localização de outra proteína. Como nova estratégia para a utilização de proteínas recombinantes, foram construídos vetores que propiciam a fusão das miosinas a etiquetas menores, como FLAG e HA. Para a obtenção de antissoro mais específico, foram encomendados peptídeos antigênicos sintéticos para serem inoculados em camundongos a partir da sequência das miosinas TcMyo1, TcMyo13 e TcMyoC obedecendo critérios de imunogenicidade. Após a transfecção dos vetores codificadores de miosinas fusionadas à FLAG, ensaios de *Western blot* e imunofluorescência foram realizados utilizando anticorpo anti-FLAG. Os antissoros produzidos através da imunização por peptídeos em camundongos não apresentaram uma qualidade adequada pois reconheceram outras miosinas além da usada para a produção do antissoro, apesar de nenhuma outra proteína de *T. cruzi* apresentar a sequência que consideramos específica de cada miosina. A análise por imunofluorescência das miosinas recombinantes TcMyo1, TcMyo13, TcMyoA, TcMyoC, TcMyoD e TcMyoE mostraram uma localização proteica dispersa pelo citoplasma, porém com algumas miosinas apresentando uma localização flagelar (TcMyo1 e TcMyoD). É necessário, entretanto, uma confirmação desta localização utilizando outra estratégia, que seria a produção de antissoro, pois não só a etiqueta pode estar



interferindo com a correta localização da miosina, como também o aumento da quantidade proteica pode estar alterando o correto endereçamento celular da quantidade excedente.



86. CARACTERIZAÇÃO DO METILPROTEOMA DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

Rafael Fogaça de Almeida¹, Aline Castro Rodrigues Lucena¹, Michel Batista¹,

Fabricio Klerynton Marchini^{1 2}, Marco Aurelio Krieger^{1 2} e Lyris Martins Franco de Godoy¹

¹ Laboratório de Genômica Funcional, Instituto Carlos Chagas/ Fiocruz-PR, Curitiba, PR, Brasil

² Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

E-mail: lmfgodoy@fiocruz.br

Introdução: A metilação pós-traducional de proteínas, a qual ocorre em argininas e lisinas, modula diversos processos biológicos, em diferentes níveis de sinalização celular. Em *Trypanosoma brucei*, metilargininas estão envolvidas em processos fundamentais como metabolismo de RNA, tráfego de proteínas e patogênese. No entanto, um estudo em larga escala analisando a presença e o papel da metilação de proteínas em *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, ainda não havia sido realizado. Desse modo, visando preencher essa lacuna, no presente trabalho foi analisada a presença da maquinaria de metilação/demetilação e caracterizado o metilproteoma de *T. cruzi* em resíduos de arginina e lisina, através de proteômica baseada em espectrometria de massas (LC-MS/MS). **Metodologia:** A busca *in silico* pela maquinaria de metilação e demetilação de *T. cruzi* foi realizada na plataforma TritypDB (<http://tritypdb.org>) e a identificação de suas homólogas em *T. brucei* e *H. sapiens* foi realizada através do algoritmo BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). A identificação de domínios funcionais nas sequências de *T. cruzi*, *T. brucei* e *H. sapiens* foi feita na plataforma *Conserved Domains Database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) e os alinhamentos da região dos domínios pela ferramenta Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Células epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c foram cultivadas em meio LIT + 10% de soro bovino fetal a 28 °C. O extrato total de proteínas foi separado por SDS-PAGE em gel gradiente 5-20% e dividido em 10 frações, as quais foram submetidas separadamente à digestão trípica em gel. Os peptídeos provenientes de cada fração foram purificados em microcolunas C18 e analisados por LC-MS/MS. A identificação de proteínas e sítios de metilação foi realizada através da plataforma de proteômica computacional MaxQuant (versão 1.5.2.8). **Resultados e Discussão:** As análises *in silico* indicaram que *T. cruzi* possui metiltransferases de lisina, metiltransferases de arginina e demetilases JmjC, as quais são conservadas em *T. brucei* e humanos. Mesmo muitas estando descritas como proteínas hipotéticas conservadas em *T. cruzi*, nossas análises demonstram que pela conservação de sua estrutura funcional provavelmente estas proteínas compõem a maquinaria de metilação/demetilação nesse organismo. Nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, foram identificadas 878 proteínas metiladas e 1336 sítios de metilação sendo 657 metilargininas e 679 metil-lisinas. Em *T. cruzi*, a



metilação em arginina e lisina regula processos distintos. As proteínas metiladas em arginina estão envolvidas em diferentes processos como oxiredução e metabolismo de carboidratos em *T. cruzi*. Isso difere do que foi previamente descrito para *T. brucei*, onde a metilação em arginina está envolvida, principalmente, em funções do citoesqueleto e locomoção. Além da metilação em arginina nosso trabalho também analisou o impacto da metilação em lisina em *T. cruzi*, e demonstrou que ela está envolvida majoritariamente na síntese de proteínas. Além disso, foram identificadas 62 proteínas apresentando coocorrência de sítios de metilação e fosforilação, sugerindo um possível *crosstalk* entre estas duas modificações pós-traducionais, o qual depende de futuras investigações para confirmação. Conclusão: Esse trabalho representa a primeira análise, em escala proteômica, do metilproteoma de *T. cruzi*, demonstrando que a metilação está envolvida em vários processos fundamentais do parasito. É também o primeiro a caracterizar a metilação em lisinas de modo global em tripanossomatídeos. Coletivamente, os dados deste trabalho informam sobre novos aspectos biológicos fundamentais de *T. cruzi* e podem contribuir na identificação de peças chave no processo de adaptação e infecção pelo parasito e, em última instância, indicando possíveis alvos quimioterápicos.



87.A BUSCA POR NOVOS CANDIDATOS VACINAIS CONTRA A MALÁRIA VIVAX ATRAVÉS DA VACINOLOGIA REVERSA

Almeida, R. P. M., Albrecht, L.

Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR

E-mail: rod.pma@gmail.com

A Malária é uma das principais parasitoses humanas. Em 2015 foram 212 milhões de casos segundo a Organização mundial da Saúde. Os dois principais parasitas causadores da doença são o *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. Embora haja muitos esforços no combate à malária falciparum, o mesmo não pode ser dito sobre a malária vivax. Além de combater o vetor, outra maneira de prevenir a doença é através do desenvolvimento de vacinas. Para alcançar esse objetivo, uma análise *in silico* usando o genoma de *P. vivax* foi feita. Uma base de dados para candidatos vacinais de malária e um servidor de predição de antigenicidade foram utilizados para iniciar a abordagem através da vacinologia reversa. O primeiro critério foi selecionar proteínas preditas adesivas, indicando seu potencial envolvimento na interação entre o parasita e as células do hospedeiro. O segundo critério foi a antigenicidade e o terceiro a presença de epítomos de célula B e T. Também levando em consideração as homologias, os domínios e os motivos de proteínas através do BLAST, os candidatos foram selecionados. O próximo objetivo do projeto é investigar o potencial vacinal dos candidatos através de ensaios de adesão e reatividade com soros de pacientes que já tiveram malária.

Apoio Financeiro: CAPES, Fiocruz/PR, CNPq.



88. POLIMORFISMOS DO GENE *FCN1* NA FEBRE REUMÁTICA E CARDIOPATIA REUMÁTICA CRÔNICA

Sandra Jeremias Catarino¹; Fabiana Antunes Andrade¹; Angelica Beate Winter Boldt²; Iara Jose Messias-Reason¹

¹ Departamento de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná

² Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná

E-mail: iaramessias@yahoo.com.br

Introdução: A Febre Reumática (FR) e a Cardiopatia Reumática Crônica (CRC) são complicações decorrentes de resposta imune tardia à faringoamigdalite causada pelo *Streptococcus* do grupo A (GAS) em populações geneticamente predispostas. O sistema complemento desempenha um importante papel na resposta imediata contra infecções por patógenos, sendo ativado por três vias: clássica, alternativa e das lectinas. A via das lectinas é iniciada pela ligação de Padrões de Reconhecimento de Moléculas (PRMs) (MBL, CL-K1 e ficolinas) à oligossacarídeos e resíduos acetilados da superfície microbiana. As ficolinas são mediadores solúveis que reconhecem uma ampla gama de PAMPs (Padrões Moleculares associados a Patógenos), levando a opsonização e fagocitose de patógenos pela ativação do complemento. Três ficolinas humanas são descritas (-1, -2 e -3), cada uma codificada pelo seu próprio gene. A ficolina-1 reconhece compostos acetilados, incluindo N-acetilglicosamina e N-acetilgalactosamina, ligando-se a diversos microrganismos incluindo o GAS. A ficolina-1 também desempenha um papel na modulação da interação celular imune e na coagulação. Neste trabalho estudamos o papel de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *FCN1*, que codifica a proteína ficolina-1, em pacientes com FR e CRC.

Metodologia: foram genotipados 5 SNPs (rs2989727 [-1981 G>A]; rs10120023 [-542 G>A], rs17039495 [-399 G>A], rs10117466 [-144 C>A] e rs10858293 [+33 G>T]) da região promotora do gene *FCN1* através de 3 reações de PCR-SSP simples e bioespecíficas em 193 pacientes com diagnóstico de FR (92 com CRC, 42 sem acometimento cardíaco e 59 sem dados clínicos) e em 193 controles saudáveis.

Resultados e discussão: todos os SNPs pesquisados tiveram associação com a doença. O alelo A, de menor frequência, do SNP rs17039495 (-399 G>A) foi associado com suscetibilidade à doença (P=0,006, OR 4,953). Os demais SNPs tiveram seu alelo de menor frequência relacionados com proteção à doença: rs2989727 (-1981 G>A): P<0,001, OR 0,574; rs10120023 (-542 G>A): P<0,001, OR 0,475; rs10117466 (-144 C>A): P<0,001, OR 0,383; rs10858293 (+33 G>T): P=0,004, OR 0,592. **Conclusão:** Nossos resultados indicam que SNPs no gene *FCN1*, que modulam a expressão da proteína ficolina-1, tem um papel na suscetibilidade a FR e CRC, enfatizando o papel da via das lectinas nesta doença.



89. CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Macrocybe titans* POLYSACCHARIDE

Shayane da Silva¹; Stelée Marcela Petris Biscaia²; Fhernanda Ribeiro Smiderle¹; Fabio Rogerio Rosado³; Edvaldo da Silva Trindade²; Marcello Iacomini¹

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Parana, Curitiba-PR, Brazil

² Department of Cellular Biology, Federal University of Parana, Curitiba-PR, Brazil

³ Department of Biosciences, Federal University of Parana, Palotina-PR, Brazil

One of the most observed type of cancers in Brazil is the skin cancer. Melanoma is the most aggressive form, which presents low response to current treatments when it is diagnosed at advanced stages. Treatments with a better response and fewer side effects are required to improve the quality of life and survival of patients. It was observed that compounds isolated from natural sources, such as polysaccharides, present promising antitumor activities. Polysaccharide extracts from edible mushrooms are used in traditional medicine for cancer treatment since 1980. Furthermore, some clinical trials demonstrated that such molecules improved NK cells activity in patients undergoing chemotherapy, and reduced chemotherapy-associated side effects. A diversity of mushrooms have been studied and their compounds have presented promising results, but several species have never been explored. Based on this, a giant mushroom, *Macrocybe titans* was studied about their polysaccharides. The lipids were removed from milled fruiting bodies with chloroform:methanol, 2:1 and the residue was extracted with distilled water under mechanical stirring (3x). The extract was separated by centrifugation, concentrated under reduced pressure and precipitated with ethanol (3:1). Polysaccharides were dialysed against distilled water (6-8 kDa) and the retained fraction was treated with α -amylase to remove glycogen and submitted to a purification process by freeze-thawing. Sample was centrifuged and the supernatant, containing cold-water soluble polysaccharides, was dialysed against distilled water (1.000 kDa). The eluted fraction was analysed by HPSEC and presented a homogeneous profile and molar mass of 14.2×10^3 g/mol. According to GC-MS analysis, this fraction contained galactose and fucose at a rate of 83:17, respectively. The methylation analysis showed the presence of 2,3,4-Me₃-Galp (56%), 3,4-Me₂-Galp (21.9%), 2,3,4-Me₃-Fucp (20.7%) and 2,3,4,6-Me₄-Galp (1.4%) derivatives, corresponding to 6 \rightarrow -Galp(1 \rightarrow ; 2,6 \rightarrow -Galp(1 \rightarrow ; Fucp(1 \rightarrow and Galp(1 \rightarrow units, respectively. The ¹³C-NMR spectrum showed signals in the anomeric region at δ 101.7, 98.6, 98.5 and 97.8 corresponding to C-1 of Fucp units; 2,6-di-O- and 6-O-substituted Galp, respectively. These data were consistent with a fucogalactan with a main chain composed of (1 \rightarrow 6)-linked α -D-Galp, branched at O-2 position by non reducing ends of α -L-Fucp. This heteropolysaccharide were are also found in other mushrooms, but this is the first time they were isolated from *M. titans*. Similar fucogalactans isolated from



other mushroom species presented antinociceptive and anti-inflammatory effects when tested in mice. Furthermore, it was observed a reduction in late mortality rate of murine sepsis models. Considering such studies, the aim of the present work was to evaluate a possible anticancer effect of this fucogalactan on murine melanoma cells (B16F10). Therefore, 200 cells were cultured in 96 wells plate and treated with fucogalactan (10, 50, 100 and 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$) for different times (24, 48 and 72 hours). MTT was added three hours before the end of the treatment, formazan crystals were eluted with DMSO and absorbance was read at 550 nm. Preliminary results show that this compound changes B16F10 cells metabolic capacity, when incubated for 72h at all concentrations analyzed. These results suggest that *M. titans* fucogalactan may be cytotoxic to these cells. Further assays using other experimental methodologies are in progress and may elucidate whether fucogalactan leads melanoma cells to death and/or they are specific for tumor cells.

Financial support: CAPES.



90. UREMIC TOXINS INHIBIT AUTOPHAGIC FLUX BLOCKAGE AT THE END-STAGE OF AUTOPHAGY

Silvia D. Rodrigues¹, Donna D. Zhang², Lia S. Nakao¹

¹ Department of Basic Pathology, University of Paraná, Curitiba-PR, Brazil

² Department of Pharmacology and Toxicology, University of Arizona, Tucson-AZ, USA

E-mail: silviahellfire@gmail.com

Introduction: Uremia is a pathological condition attributed to retention of uremic compounds in blood and tissues during the end-stage of chronic kidney disease (CKD) which in healthy individuals are eliminated by the kidney. These compounds, known as Protein-Bound uremic toxins (PBUTs) and referred here as uremic toxins, can cause deleterious effect on human organism, once they are not easily removed by hemodialysis. Several reports investigations are focused in two particular uremic toxins: indoxyl sulfate (IS) and p-cresyl sulfate (pCS), both implicated in CKD progression, due to their association with increased incidence of cardiovascular events and mortality in the dialysis patients. In kidney disease, the role of autophagy remains unclear. Here we investigated the role of uremic toxins in autophagic flux. **Material and Methods:** NIH-3T3 cells were grown on 35-mm glass bottom dishes (In Vitro Scientific), tandem mRFP-GFP-LC3 construct transient transfection was performed using Lipofectamine Plus (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. After 16 hours of transfection, cells were treated with indoxyl sulfate 100 μ M, indol acetic acid 10 μ M, p-cresyl sulfate 100 μ M, bafilomycin A1 0.1 μ M or starvation for 4 hours. For live cell-imaging images were captured with a Zeiss Observer.ZI microscope by using the Slidebook 4.2.0.11 computer program (Intelligent Imaging Innovations, Inc.). **Results and Discussion:** To monitor whether the autophagic process is affected by uremic toxins, NIH-3T3 cells were transfected with a tandem fluorescent-tagged LC3 (mRFP-GFP-LC3) construct. The acidic environmental into lysosome quenches the fluorescent signal of GFP, whereas mRFP is more stable. Thus, green/red merged images indicate autophagosome (corresponds yellow/orange puncta), while red puncta correspond to an autolysosome. Positive controls were used to distinguish blockage of autophagosome clearance from increase formation of autophagosome. Starved cells had autophagosomes and autolysosomes (green and red puncta), and this result indicates that the autophagic flux is increased, during the nutrient starvation. However, when cells were treated with isolated or mixed uremic toxins, we observed mostly yellow puncta, suggesting that the mechanism by which uremic toxins affect autophagy is preventing autophagic flux by inhibiting fusion of autophagosome with lysosomes. Similar result was obtained with bafilomycin A1. **Conclusion:** In our study, we demonstrated that uremic toxins can impair the autophagy flux by inhibiting the later stage. Others studies are being conducted in our lab to understand by which mechanisms uremic toxins can disturb autophagy pathway and what is the implication of autophagy blockage at chronic kidney progression.



Funding: This study was supported by the National Cancer Institute of the National Institutes of Health under award number P30CA023074, scholarship was supported by CNPq (207359/2015-6).



91. POLIMORFISMO RS9404941 DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *APOM* EM CRIANÇAS COM DM1

Susan Webber de Souza¹, Luiza Cristina Gobor¹, Waldemar Volanski¹, Adriana Teleginski¹, Melina Marques Sousa¹, Vanessa Graciolo¹, Mauren Isfer Anghebem-Oliveira^{1,2}, Dayane Alberton¹, Geraldo Picheth¹, Fabiane Gomes de Moraes Rego¹

¹ Universidade Federal do Paraná – UFPR

² Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR.

Introdução: Define-se o *Diabetes Mellitus* (DM) como um grupo heterogêneo de doenças metabólicas caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção ou na ação da insulina. O *Diabetes Mellitus* tipo 1 (DM1) desenvolve-se através da combinação da pré-disposição genética do indivíduo associado a fatores ambientais, levando a uma destruição autoimune das células β , acarretando em uma deficiência na produção de insulina. É a forma mais comum de diabetes em crianças e adolescentes e correspondendo até 10% dos casos de DM. O gene *apoM* codifica para uma proteína de 26 kDa, a apolipoproteína M. Este gene está localizado na região de classe III do HLA (*Human Leukocyte Antigen*) no cromossomo 6p21.3, sendo esta uma das razões para relacionar este gene a imunidade do DM1. **Objetivo:** Estudar o polimorfismo rs9404941 da região promotora do gene *apoM* e correlacionar com biomarcadores de controle glicêmico. **Material e Métodos:** O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde (CAAE: 24676613.6.0000.0102). Neste estudo 317 crianças com idade até 14 anos foram divididas em dois grupos: o de crianças controle (n=169), com indivíduos saudáveis e o grupo DM1 (n=148) com indivíduos doentes. Foram quantificados biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e de função renal. Os altos valores encontrados para HbA1c (9,7%) e baixos para o 1,5-AG (2,9 μ g/mL), caracterizam o mau controle glicêmico encontrado no grupo DM1. Embora as concentrações do colesterol total, HDL, LDL e triglicérides tenham sido estatisticamente diferentes entre os grupos (P < 0,001) permanecem dentro dos intervalos de referência para os respectivos parâmetros analisados, não caracterizando os indivíduos como dislipidêmicos. Para os biomarcadores de função renal, as diferenças entre os grupos tiveram um P < 0,001, com exceção da albumina, porém os indivíduos não foram declarados com qualquer tipo de lesão renal até o fim deste estudo. A técnica utilizada para a genotipagem do polimorfismo rs9404941 foi a PCR-RFLP, sendo os produtos de PCR digeridos com a enzima de restrição *HaeIII*. **Resultados e Discussão:** O polimorfismo em estudo está no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para os grupos em estudo não houve diferença estatística significativa na comparação dos genótipos (P=0,142) e frequências alélicas (P=0,245), sugerindo a não associação desse polimorfismo ao DM1 na população estudada. A frequência para o alelo raro do polimorfismo em estudo (2,7%) foi inferior aos valores encontrados na população europeia (7,0%) e americana (4,7%). A análise de variância mostrou que o alelo C esteve associado ao aumento da glicemia ao acaso (P=0,011) e a redução do LDL-c (P=0,026) apenas em indivíduos com DM1. **Conclusão:** O polimorfismo rs9404941 da



região promotora do gene *apoM* não foi associado ao DM1, porém a presença do alelo C foi associada ao aumento da glicemia ao acaso ($P=0,011$) e a redução do LDL-c ($P=0,026$) apenas em crianças com DM1.



92. MITOCHONDRIAL LOCALIZATION OF THIOREDOXIN1

Susumu Higa Onaga and Lia S. Nakao.

Depart. of Basic Pathology (Redox) , Universidade Federal de Paraná.

E-mail: susumu.higa@ufpr.br

Introduction: Thioredoxin1 (Trx1) is an ubiquitous antioxidant protein that reduces disulfide bond in oxidized proteins. This property depends on a canonical CXXC (C is Cys and X is any amino acid) motif in Trx1 structure. Trx1 also act as scavenger of cellular reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). Trx1 is located predominantly in cytosol, but also in nucleus and extracellular milieu. A recent proteomic analyses revealed the presence of Trx1 in the intermembrane space (IMS) of yeast mitochondria. Here we investigate whether Trx1 is also present in mammalian mitochondria using biochemical and immunocytochemical methods. **Methodology:** *Mitochondria Isolation.* Mitochondria were fractionated from rat liver by differential- and Percoll-gradient centrifugation. HeLa cells mitochondria were obtained by differential centrifugation. The purified mitochondria were resuspended in RIPA buffer. The protein concentration of whole cell lysate, cytosolic fraction, crude mitochondrial fraction and mitochondrial fraction were measured (Bradford) and used for western blot (anti-Trx1, BD Bioscience; anti-AIF, Santa Cruz Biotechnology; anti-Mia40, Sigma; MitoTracker Red, Invitrogen). *Immunocytochemistry.* HeLa cells were cultured on a 13 mm coverslip in high glucose DMEM medium supplemented with 20% fetal bovine serum and gentamycin. Cells were stained with the fluorochrome MitoTracker Red and then fixed with paraformaldehyde. Free aldehyde groups were blocked with glycine. Cells were permeabilized with 0.1 % Triton x-100 and incubated with 5% BSA, 0.1 % Triton x-100. The primary antibodies (anti-Trx1, 1:200; AIF, 1:100; Mia40, 1:100) were incubated overnight, followed by incubation with secondary antibody. Images were obtained with Nikon A1R confocal microscope. **Results and discussion:** We detected small amount of Trx1 in mitochondrial fraction of rat liver and HeLa cells compared to cytosolic fraction. The purity of mitochondrial fraction was determined by the absence of β -tubulin. Immunocytochemical analyses in HeLa cells showed focal colocalization of Trx1 with MitoTracker. Trx1 also colocalized with AIF and Mia40, two IMS proteins, indicating that a small fraction of Trx1 is present in some mitochondria. We hypothesized that Trx1 play an important antioxidant role in mitochondria, possibly at the IMS. **Conclusion:** The presence of Trx1 in the mammalian mitochondria was demonstrated by western blot of cellular mitochondrial fraction and by image colocalization with MitoTracker, AIF and Mia40. This result suggests that Trx1 may play an antioxidant role in the mitochondrial.



93. PAPEL DOS RESÍDUOS DE CISTEÍNA NA PROTEÍNA *APOPTOSIS-INDUCING FACTOR*

Sze Mei Lo¹, Glaucio Valdameri², Vivian Rotuno Moure³, Lia Sumie Nakao¹

¹ Laboratório Patologia Redox, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal Do Paraná.

² Laboratório de Imunologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, Setor Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

³ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

E-mail: szemeilo93@gmail.com

Introdução: *Apoptosis-inducing fator* (AIF1) é uma flavoproteína que se encontra com a porção N-terminal ancorada na membrana interna da mitocôndria e com a porção C-terminal voltada para o espaço intermembranas. Uma das atividades mais conhecidas é a indução à apoptose, que ocorre quando AIF transloca da mitocôndria para o núcleo levando à fragmentação do DNA. Um dos resíduos de cisteína da AIF pode estar modulando de forma redox a atividade apoptogênica, pois em outros estudos foi observado que quando o AIF é incubado com *para-chloromercuriphenylsulfonic acid* (pCMPS), um bloqueador de tiol, ocorre a diminuição da atividade apoptótica do AIF1. Portanto o papel dos 3 resíduos de cisteínas presentes na proteína ainda deve ser elucidado. **Metodologia:** Células HEK293T foram transfectadas transientemente com os construtos de expressão eucariótica de AIF selvagem, C256S, C317S e C441S, todos com etiqueta de hemaglutinina (HA). Após 48h, foi feito tratamento com indutor de apoptose estaurosporina 2µM, por duas horas. As células foram marcadas com Anexina V-FITC e analisadas por citometria de fluxo, determinando a quantidade de células em apoptose. Em paralelo hAIFΔ1-120 recombinante foi submetida a oxidação com peróxido de hidrogênio (50, 150 e 300 µM) e diamida (0,5, 1 e 2 mM) para avaliar possíveis modificações pós traducionais nas cisteínas. A análise foi realizada por SDS-PAGE (condição redutora e não redutora) seguida de coloração com Coomassie blue. **Resultados e Discussão:** Tanto as células controle quanto as superexpressas com AIF selvagem responderam à indução com estaurosporina, dobrando a quantidade de células em apoptose (2,4 e 2,6 vezes maior em relação à condição sem estaurosporina). Porém, nas células expressando AIF com mutações C256S e C317S, a quantidade de células apoptóticas em resposta à droga, tendeu a ser menor (1,9 e 1,7 vezes maior em relação à condição sem estaurosporina), o que pode refletir a importância desses resíduos na função apoptogênica da proteína. A mutação C441S levou a maior morte em relação ao seu controle (3,9 vezes). A oxidação da hAIFΔ1-120 recombinante com peróxido de hidrogênio (50, 150 e 300 µM por 15 minutos) não apresentou alterações, já com diamida (0,5, 1 e 2 mM por 15 minutos) houve a formação de produtos com massa molecular maior, os quais desaparecem em



condições redutoras. Estes dados indicam que ocorre formação de pontes dissulfeto intermolecular. **Conclusões:** É possível observar uma tendência das mutações nas cisteínas das posições 256 e 317 responderem menos ao estímulo apoptótico, podendo refletir em uma possível participação desses resíduos na atividade de indução a morte celular da AIF. Uma das cisteínas também pode estar envolvida na formação de ponte dissulfeto intermolecular.



94. MÉTODO MOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS À SEPSE

Taís Franco de Carvalho¹, Eduardo Rocha Amazonas², Márcia Regina Pincerati², Juliane Soldi Malgarin², Marco Aurélio Krieger¹, Luís Gustavo Morello¹

¹ Instituto Carlos Chagas - ICC/Fiocruz - Curitiba (PR), Brasil

² Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP - Curitiba (PR), Brasil

E-mail: taisfc25@gmail.com

Sepse é a disfunção de múltiplos órgãos causada por uma resposta inflamatória desregulada do corpo secundária a uma infecção. É considerada a principal causa de mortes em UTI em todo mundo e sua incidência tem apresentado aumento com uma pequena redução na mortalidade. De acordo com dados do Instituto Latino Americano da Sepsis (ILAS), são registrados cerca de 400 mil novos casos todos os anos no Brasil que resultam em mais de 240 mil óbitos. Estudos mostraram que o tratamento antimicrobiano inicial inadequado ocorre em cerca de 20% dos casos de choque séptico e este resulta em uma redução de cinco vezes na taxa de sobrevivência dos pacientes. É imprescindível então um método diagnóstico rápido e preciso como é preconizado pela Guideline da Surviving Sepsis Campaign que indica que a administração do antibiótico intravenoso adequado deve ocorrer 1 hora após reconhecimento de sepsis. O diagnóstico por hemocultura ocasiona em resultados positivos em apenas entre 28 e 60% dos casos de sepsis e devido à dificuldade deste teste de detectar microrganismos fastidiosos este diagnóstico pode levar dias. Por esses motivos, avanços têm sido feitos em biologia molecular para oferecer alternativas mais rápidas e precisas. O mais promissor entre estes avanços é a detecção por PCR multiplex diretamente do sangue. O teste molecular multiplex associado à microarray proposto no projeto oferece melhora nos aspectos de tempo de processamento, sensibilidade e especificidade em relação aos métodos disponíveis atualmente. O multiteste é fundamentado na amplificação e hibridização de ácidos nucleicos com a plataforma In-Check™ (STMicroelectronics). Regiões conservadas no genoma dos microrganismos contemplados no painel do teste que possuam variabilidade interna foram selecionadas e primers que as amplificam foram desenhados. Dentro destas regiões amplificadas foi feito o desenvolvimento de sondas para detectar e discriminar os diferentes alvos. Em seguida, o biochip foi testado com amostras de DNA extraídas de microrganismos em cultivo caracterizadas por métodos de microbiologia tradicional e sequenciamento para validação de primers e sondas e otimização do protocolo de PCR e hibridização. Atualmente, está em progresso a avaliação do teste frente a amostras extraídas de sangue contaminado artificialmente para determinação da sua especificidade analítica e sensibilidade analítica através de curva de contaminação de concentrações conhecidas. Por fim serão feitas análises com amostras clínicas de pacientes com suspeita de sepsis para se contrastar o resultado do teste proposto com o padrão ouro do diagnóstico atual, a hemocultura. O desenho de primers e sondas foi



finalizado e a otimização do protocolo de amplificação e hibridização foi validada laboratorialmente com amostras de DNA extraída de cultivo. O teste está sendo avaliado com amostras de DNA extraído de sangue contaminado artificialmente com resultados prévios. Os testes de especificidade analítica mostram sondas específicas para 12 bactérias gram-negativas, o complexo *Burkholderia*, 8 gram-positivas e 5 espécie de *Candida*. A determinação do limite de detecção do painel para os representantes já testados está entre 100 e 10 UFC/mL de sangue o que é condizente com a realidade clínica de densidade bacteriana no sangue periférico de um paciente séptico. O teste pode promover a detecção mais rápida dos microrganismos causadores da infecção e possibilitaria o manejo clínico mais eficiente dos pacientes antes da progressão do quadro séptico com a administração de antibiótico adequado minimizando o impacto na sobrevida do paciente.



95. MANEJO FARMACOTERAPÊUTICO EM PACIENTES COM CARCINOMA PULMONAR

Taise Aparecida Maieski

Acadêmica do Curso de Farmácia do Centro Universitário Campos de Andrade – Uniandrade, Curitiba – Paraná.

E-mail: taaisek@gmail.com

O termo câncer é utilizado para designar um amplo grupo de doenças, as neoplasias, que apresentam crescimento anormal e autônomo das células, devido à perda do controle de divisão e apoptose (INCA 2017 A). O câncer é classificado de acordo com a morfologia e histologia das células e o tecido de origem, sendo designado benigno quando as células em crescimento são semelhantes às células do tecido de origem e taxa de crescimento é lenta ou maligno quando as células se multiplicam rapidamente, de forma desordenada e tem capacidade de invadir outros órgãos ou tecidos, caracterizando metástase. Entre as neoplasias malignas, o carcinoma de pulmão (CP) é o mais comum, apresentando aumento da incidência mundial de 2% ao ano. Embora seja de causa multifatorial, apresenta maior incidência nos homens e o terceiro maior nas mulheres. A taxa de mortalidade é de mais de 90%, ocupando o primeiro lugar em mortalidade por câncer no sexo masculino e em segundo no sexo feminino. Além do elevado índice de mortalidade, o tempo de sobrevida é reduzido: 13-15% dos pacientes sobrevivem em média 5 anos. O curto tempo de sobrevida se deve, principalmente, ao diagnóstico tardio, feito quando a doença já está muito avançada, impedindo o tratamento curativo. O tratamento do CP é realizado de acordo com o estadiamento da doença, podendo ser realizada cirurgia, radioterapia ou quimioterapia. Em alguns casos, pode também haver a combinação de duas ou mais terapias. A quimioterapia utiliza de compostos químicos para tratar de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, é chamada de terapia antineoplásica. Os agentes antineoplásicos possuem vários mecanismos de ação, podendo reduzir o crescimento do tumor, amenizar os sintomas da doença ou realizar a destruição das células doentes do tumor. O uso de drogas antineoplásicas isoladas se mostrou ineficiente, sendo então utilizada a poliquimioterapia, que possui eficácia comprovada. A combinação de medicamentos antineoplásicos pode elevar o potencial de interações medicamentosas, não somente entre os antineoplásicos, mas também com outros medicamentos prescritos. As interações medicamentosas são indesejáveis e frequentemente prejudiciais ao paciente, podendo comprometer o tratamento realizado, causar ou aumentar as reações adversas, potencializar ou diminuir o efeito dos medicamentos utilizados. O farmacêutico cada vez mais tem participado das equipes de cuidados multidisciplinares, destacando a importância de se realizar um acompanhamento farmacoterapêutico eficaz. No cuidado ao paciente, o farmacêutico realiza principalmente a revisão da prescrição médica, considerando os exames laboratoriais e a evolução clínica, entrevista ao paciente, anamnese farmacológica e elaboração do plano de cuidado e intervenção farmacêutica. Ao observar uma terapia que se mostra desnecessária, ineficiente, que cause desconfortos ao paciente ou tenha potenciais



interações medicamentosas, o farmacêutico deve elaborar um plano de cuidado alternativo, buscando proporcionar a melhor qualidade de vida possível ao paciente. Esse plano alternativo de cuidado farmacêutico também pode ser chamado de manejo farmacoterapêutico.



96. PROTEOMA DO TECIDO MAMÁRIO NÃO TUMORAL CONTRALATERAL E COMPARAÇÃO COM O TUMOR PRIMÁRIO CORRESPONDENTE

Talita Helen Bombardelli Gomig¹; Aline Castro Rodrigues Lucena²; Amanda Moletta Gontarski¹; Michel Batista²; Kelly Cavalcanti Machado²; Rubens Silveira Lima³; Cícero de Andrade Urban³; Fabricio Klerynton Marchini²; Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro¹; Iglener João Cavalli¹

¹ Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

² Instituto Carlos Chagas/ Fio Cruz Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

³ Unidade da Mama, Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, Paraná, Brasil.
talitahbg@gmail.com

A glândula mamária humana apresenta uma estrutura complexa, com um sistema integrado de renovação tecidual, regulado por diversos fatores que, em conjunto, atuam no remodelamento cíclico da mama. Alterações na expressão de proteínas-chave podem comprometer múltiplas vias relacionadas à proliferação, inibição da apoptose, migração, invasão e metástase. O estabelecimento do perfil proteico para o tecido mamário não tumoral, incluindo o contralateral pela sua localização em relação ao tumor, é fundamental para caracterizar a mama em estado saudável e possibilitar a inferência de alterações envolvidas na transformação e progressão neoplásica. O principal objetivo deste estudo foi descrever as proteínas expressas pelo tecido mamário não tumoral contralateral (TMC), comparando com o tecido ipsilateral (TMI) e tumores primários correspondentes (TMT). Amostras de oito pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal invasor (CDI) foram incluídas neste estudo. A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) e a espectrometria de massa MALDI-TOF foram utilizadas para analisar as proteínas. Cento e dez spots foram identificados no TMC e corresponderam a 62 proteínas distintas, categorizadas em nove classes funcionais. Para 43 destes spots, verificou-se a mesma identificação no TMI e relevante similaridade foi observada no *matching* entre estes tecidos não tumorais (TMC e TMI). A comparação com o tumor primário resultou na identificação de seis proteínas diferencialmente expressas ($p < 0,05$): ENOA, K2C8, SBP1, ANXA1, GPDA e GSTP1. Essas proteínas apresentam funções celulares relacionadas ao fenótipo do tumor, incluindo organização do citoesqueleto, regulação da glicólise e processos de redução/oxidação. Os resultados indicam as principais proteínas expressas pelo TMC e alvos relevantes que podem ter função na tumorigênese mamária. A similaridade observada entre os tecidos não tumorais demonstram a possibilidade de utilização do tecido ipsilateral como amostra controle em estudos comparativos.



97. ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DE INTERAÇÕES PROTEICAS EM TECIDOS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS DE PACIENTES PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA

Talita Helen Bombardelli Gomig¹, Amanda Moletta Gontarski¹, Rubens Silveira Lima², Cícero de Andrade Urban², Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro¹, Iglénir João Cavalli¹

¹ Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

² Unidade da Mama, Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, Paraná, Brasil.

E-mail: talitahbg@gmail.com

Métodos proteômicos permitem a caracterização do conteúdo proteico de amostras biológicas, possibilitando a identificação de proteínas expressas sob condições fisiológicas específicas. A detecção e a análise de interações proteicas também constituem um importante instrumento no estudo de doenças como o câncer, uma vez que os processos celulares mediados por proteínas geralmente envolvem diversas interações, com formação de complexos multiproteicos e interações binárias essenciais para a função biológica. No câncer de mama, a proteômica torna-se uma relevante abordagem para identificar a expressão diferencial de proteínas em estágios distintos da progressão tumoral. Informações de expressão proteica em conjunto com estudos de interactoma permitem analisar as proteínas no contexto de suas funções biológicas na tumorigênese mamária. O presente estudo tem por objetivo analisar interações de proteínas diferencialmente expressas entre os tecidos mamários não tumoral (ipsilateral e contralateral), do tumor e do linfonodo axilar metastático correspondentes de pacientes portadoras de carcinoma mamário, no contexto de suas funções biológicas na tumorigênese mamária. Amostras de tecido mamário tumoral e não tumoral de uma paciente diagnosticada com carcinoma ductal invasor (CDI) foram utilizadas na padronização das etapas iniciais do estudo, realizada a partir de protocolos obtidos na literatura, incluindo testes com modificações. A sequência de etapas para a adequação dos protocolos às amostras de tecido mamário humano incluíram testes relacionados a: lise química (reagentes) e mecânica (*TissueLyser II*, Quiagen); remoção padrão de reagentes incompatíveis com a espectrometria de massas; dosagem de proteínas por *Qubit 2.0 Fluorometer* (Life Technologies); eliminação de contaminantes através de corrida em gel de poliacrilamida unidimensional (1D); tripsinização *in-solution* e *in-gel*; dosagem dos peptídeos em *NanoDrop ND 1000* (Thermo Scientific); purificação dos peptídeos em *Stage-tips*; e identificação dos peptídeos através de nano cromatografia líquida (LC) acoplada a espectrometria de massa ESI-MS/MS (*Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*). A partir da análise dos espectros obtidos nos testes foi possível definir os seguintes parâmetros: emprego de maceração do tecido através do equipamento *TissueLyser II* (Quiagen) com a amostra embebida em tampão de lise (4% SDS, 100mM Tris-HCl pH



7,6 e 0,1M DTT), seguida por FASP (*Filter Aided Sample Preparation*); seleção do protocolo de extração de maior intensidade e qualidade na identificação dos peptídeos e das modificações necessárias para aprimorar os resultados; emprego de gel de poliacrilamida 1D e tripsinização das proteínas a partir do gel; tipo de coluna e tempo de corrida no LC-ESI-MS/MS, além de outras especificações técnicas. Os resultados obtidos nestes testes permitiram a execução da extração proteica e preparo das amostras para MS de dez pacientes incluídas no estudo até o momento. Estas amostras aguardam a análise no LC-ESI-MS/MS.



98. OCORRÊNCIA DE SÍFILIS NO LABORATÓRIO MUNICIPAL DE LAGES SC

Tatiane Antunes dos Santos¹, Melina Daiana Alves²

¹Graduanda do curso de Biomedicina (UNIFACVEST)

²Farmacêutica-bioquímica (Laboratório Municipal de Lages)

E-mail: taatyantu@hotmail.com

Sabe-se que a sífilis é uma doença infecciosa crônica provocada por uma bactéria do filo espiroqueta, o *Treponema pallidum*, que desafia há séculos a humanidade, acometendo praticamente todos os órgãos e sistemas, e mesmo a população tendo fácil acesso ao diagnóstico e tratamento, essa doença vem se mantendo como um problema de saúde pública até os dias atuais. Diante de tal problema é muito importante avaliar o perfil epidemiológico de sífilis para decidir quais medidas de prevenção e controle são mais indicadas. **Objetivo:** Levantar a ocorrência de sífilis na população atendida no Laboratório Municipal de Lages, através de teste rápido. **Material e Métodos:** Um estudo descritivo, retrospectivo, com base em testes rápidos, utilizando-se das fichas de cadastro referentes aos atendimentos realizados no período de fevereiro a Dezembro de 2016, no Laboratório Municipal de Lages/SC. **Resultados:** Foram realizados 1899 testes rápidos para sífilis. Destes 746 eram mulheres, dentre elas 237 apresentaram resultado reagente para sífilis, 304 eram gestantes onde 35 apresentaram resultados reagentes. Os homens que realizaram teste rápido foram 849, sendo reagente para sífilis o total de 181. **Discussão:** Ressaltamos a alta ocorrência de sífilis em pacientes na faixa etária de 18 a 39 anos, reforçando a importância de promover o uso de medidas preventivas. **Conclusão:** A ocorrência encontrada nesse estudo foi semelhante à encontrada pela OMS (Organização Mundial da Saúde) em 2016, portanto a sífilis continua a ser um importante problema de saúde pública.



99. ACONSELHAMENTO GENÉTICO E INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DE FAMÍLIAS COM HISTÓRICO DE CÂNCER NA COMUNIDADE MENONITA DE WITMARSUM (PR)

Tayana Schultz Jucoski¹, Roberto Rosati², Danielle Malheiros Ferreira¹, Iglenir João Cavalli¹, Angelica Beate Winter Boldt¹, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro¹

¹ Departamento de Genética. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, Brasil

² Instituto de Pesquisa Pelé-Pequeno Príncipe. Curitiba, Paraná, Brasil

E-mail: tayanaschultz@gmail.com

O câncer é um conjunto de doenças que apresenta diversas causas e uma grande complexidade podendo (em cerca de 5% dos casos) ocorrer de forma hereditária, quando uma mutação ocorre na linhagem germinativa e é transmitida ao longo das gerações de uma família dando origem às síndromes familiares. A comunidade menonita de Witmarsum (PR), por intermédio de uma representante, manifestou a percepção de que ali ocorriam muitos casos de câncer em determinadas famílias. Considerando o histórico de comunidade com grande número de casamentos consanguíneos, o que poderia ter ocasionado aumento nas frequências de determinados genes, foi proposto um estudo voluntário entre as famílias desta comunidade para se realizar o levantamento de casos e o aconselhamento genético através da aplicação de questionário, cálculo de risco para alguns tipos de câncer (ovário, mama, colorretal, endométrio e melanoma) e para mutações em genes relacionados (*BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH6*, *MSH2* e *CDKN2A*). Dez famílias se voluntariaram, das quais três preencheram os critérios estabelecidos para síndromes conhecidas, como a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditária (HBOC) em duas famílias e a Neurofibromatose do Tipo 1 (NF1) em uma terceira. Membros destas famílias foram selecionados para análises moleculares de sequenciamento de exoma por NSG e PCR-ARMS para confirmação da mutação em outros indivíduos. Na família diagnosticada com NF1 foi encontrada, em cinco indivíduos, a mutação c.3601delT no gene *NF1* que altera o quadro de leitura levando à produção de neurofibromina truncada. Além disso, para dois indivíduos desta família portadores de NF1 com fenótipos distintos (P.H.: NF1 com hemangioma e P.M.: NF1-Síndrome de Noonan), a partir do sequenciamento de exoma foram sugeridos prováveis genes moduladores que podem justificar a variabilidade fenotípica (*A2ML1*, *CCM2*, *RPS6KA1*, *RIT1*). As demais famílias analisadas não preencheram critérios clínicos para síndromes já descritas e foram classificadas como portadoras de casos esporádicos de câncer.



100. NA VANGUARDA DA ONDA DA NANOTECNOLOGIA: CARACTERIZAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO E SEUS EFEITOS SOBRE CÉLULAS DE MAMÍFERO

Thamile Luciane Reus^{1 3}, Thiago Neves Machado², Ariane Caroline Campos Paschoal¹, Ana Paula Ressetti Abud^{1 3}, Crisciele Kuligovski^{1 4}, Arandi Ginane Bezerra Jr², Alessandra Melo de Aguiar^{1 3}, Bruno Dallagiovanna^{1 3}

¹ Instituto Carlos Chagas – Fiocruz Paraná

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná

³ Universidade Federal do Paraná

⁴ Instituto de Biologia Molecular do Paraná

E-mail: thamilelreus@gmail.com

Introdução: As nanopartículas (NPs) tem grande potencial de aplicação tecnológica. Dentre elas, destacam-se as NPs de bismuto (BiNPs). Estas NPs são bastante interessantes pelo fato de apresentarem propriedades bactericidas e fungicidas, além de representarem uma promessa no campo da imagenologia. Em relação a sua toxicidade, muito pouco se tem descrito na literatura sendo que até o momento ainda não há um consenso quanto ao efeito destas NPs sobre sistemas biológicos. Uma melhor compreensão acerca da toxicidade destas NPs pode ajudar a evitar ou prever efeitos adversos, bem como auxiliar em sua construção posto que em muitos casos, modificações na superfície das NPs podem torná-las menos tóxicas, permitindo seu emprego em aplicações biomédicas. A fim de entender as interações destas NPs com os sistemas biológicos, ensaios *in vitro* com uso de células de mamíferos consistem em um método de *screening* mais aplicável. A linhagem celular BALB/c 3T3 clone A31, derivada de embrião de camundongo, é recomendada pelas agências regulatórias internacionais para predição de toxicidade; representando um bom modelo para avaliar o efeito da interação de NPs com sistemas biológicos e por fim, possibilitando extrapolar a partir de quais doses estas NPs se tornam tóxicas, bem como o mecanismo de ação das mesmas. **Metodologia:** NPs de bismuto foram sintetizadas por meio de síntese física através de ablação por raio laser. Estas NPs foram caracterizadas quanto ao seu tamanho (Espalhamento de Luz Dinâmico - DLS), morfologia (Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET), potencial zeta (analisador de partículas) e sua concentração foi calculada através de espectrofotometria. As mesmas foram estabilizadas através de formação de corona NP-proteína por meio da adição de: 1) proteínas de meio de cultivo e 2) albumina de soro bovino 0,05%. Todas as caracterizações foram realizadas nas condições: 1) BiNPs puras (BiNP_{água}); 2) BiNPs com corona do meio (BiNP_{meio}); 3) BiNPs com corona de albumina (BiNP_{BSA}). Para avaliação da citotoxicidade foi utilizada a metodologia de captação de vermelho neutro, permitindo calcular os valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀. **Resultados e discussão:** As



BiNPs possuem um tamanho médio de 47 nm (BiNP_{água}), 52 nm (BiNP_{meio}) e 49 nm (BiNP_{BSA}) e estão em uma concentração de 0,7 mg/ml. Por MET, possuem formato arredondado com presença de partículas aciculares (BiNPs_{água}), ou “nuvens” de proteína ao redor das mesmas (BiNP_{meio} e BiNP_{BSA}). Em relação ao potencial zeta, os valores variam de 39,1 mV (BiNPs_{água}) até -20,2 mV (BiNP_{meio}) e -23,8 mV (BiNP_{BSA}). Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com BiNPs estabilizadas com ambas coronas de meio e BSA. Em relação a citotoxicidade, os valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ foram 78,32±18,90, 28,51±9,96 e 9,18±6,51 para BiNP_{meio} e 71,82±16,67, 25,54±8,37 e 8,60±3,35 para BiNP_{BSA}. **Conclusão:** As BiNPs são NPs que necessitam da formação de corona proteica a fim de evitar sua oxidação. Esta corona, além de manter a estabilidade das NPs e seu tamanho médio também modifica sua carga. Os ensaios de citotoxicidade não indicaram diferenças significativas entre as BiNPs estabilizadas com meio ou BSA. Os mecanismos de interação e morte celular estão sendo investigados no momento e podem contribuir de forma a elucidar os efeitos de BiNPs sobre sistemas biológicos.

Fonte financiadora: CAPES, Fundação Araucária, CNPq, Fiocruz.



101. POLYMORPHISMS OF THE COMPLEMENT SYSTEM MODULATE SUSCEPTIBILITY TO PEMPHIGUS FOLIACEUS

Valéria Bumiller Bini, Rodrigo Coutinho de Almeida, Maria Luiza Petzl-Erler, Danillo Gardenal Augusto, Angelica Beate Winter Boldt.

Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Brasil

Pemphigus foliaceus (PF) is an autoimmune disease endemic in Brazil, also known as “Fogo Selvagem” due to burning sensation. PF is characterized by the presence of autoantibodies specific against epitopes of desmoglein 1. A process called acantholysis, which is the loss of epidermal cell adhesion, accompanies this, leading to painful skin blisters. The recognition of exposed desmosomal neoantigens results in activation of the complement system (CS), a proteolytic cascade that is one of the main innate mechanisms against infection and also an effector of antibody-mediated immunity. Several CS components occur in PF lesions, causing further tissue damage. Polymorphisms of CS genes alter the efficiency of complement activation and regulation. Therefore, we are investigating if they also influence PF susceptibility. We genotyped 551,839 SNPs (single nucleotide polymorphisms) in 429 samples (235 patients and 194 controls), through microarray hybridization with the Infinium® CoreExome-24 v1.1 BeadChip (Illumina). We evaluated 996 SNPs located in all 43 genes of the CS. After excluding SNPs with minor allele frequency less than 1%, or out of Hardy-Weinberg equilibrium in controls, or in strong linkage disequilibrium ($r^2 \geq 0.8$) with other tested SNPs, 203 SNPs remained. We used the PLINK and SPSS Statistics programs to perform genetic association by logistic regression and backward stepwise (Wald) analysis, respectively. We found seven SNPs associated independently with PF. These SNPs occur in five different CS genes. Two encode products that are part of the membrane attack complex (MAC), found deposited on PF lesions: *C9* (rs187875 [A/G], $p=0.028$, OR=1.42 and rs700218 [A/C], $p=0.042$, OR=0.114) and *C7* (rs2271708 [G/A], $p=0.049$, OR=0.305). Both genes are located on 5p13.1, and the ACA haplotype was associated with disease susceptibility ($p=0.0162$, OR=1.7). Two encode complement regulators, one able to block MAC formation - *CD59* (rs1047581 [A/G], $p=0.022$, OR=0.697) and the other able to block the classic and lectin complement pathways - *SERPING1* or *C1inh* (rs1005511 [G/A], $p=0.048$, OR=0.749), located on 11p13 and 11q12.1, respectively. The GA haplotype was associated with PF susceptibility ($p=0.0417$ OR=0.529). Two other genes encode receptors for complement components, whose recognition stimulate the inflammatory response and phagocytosis of apoptotic bodies. The product of the *ITGAX* gene recognize iC3b (rs11574637, $p=0.005$, OR=0.628), whereas the *C5AR1* product binds C5a (rs10404456, $p=0.016$, OR=1.419). The associated variants lead us to suggest an important role for complement regulation, MAC deposition and complement-driven removal of apoptotic bodies in the etiology of PF. Functional validation of these variants will provide a better understanding of the disease and hopefully contribute to the development of new treatment strategies.

Financial support: CAPES, CNPq



102. IDENTIFICAÇÃO DE UMA POSSÍVEL HISTONA-LINKER EM *Toxoplasma gondii*

Vanessa Rossini Severo, Mariana Sayuri Ishikawa Fragoso, Caroline de Moraes de Siqueira, Andréa Rodrigues Ávila, Sheila Cristina Nardelli

Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR

E-mail: vanessarsevero@gmail.com

A cromatina é composta de proteínas e DNA, onde reside a informação genética, que precisa se manter compactada e estável, além de acessível sempre que necessário. Por esse motivo a cromatina possui diferentes níveis de compactação: heterocromatina, forma mais compactada, que se localiza predominantemente na periferia nuclear e está relacionada ao silenciamento gênico; e a eucromatina, forma menos compactada, que reside nas porções mais centrais do núcleo, onde estão localizadas as maquinarias transcricionais. A alternância do nível de compactação da cromatina é regulada principalmente pelas histonas, que são pequenas proteínas, extremamente básicas, em torno das quais o DNA é enovelado. *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) possui as quatro histonas canônicas (H2A, H2B, H3 e H4), mas até o momento a quinta histona, H1 (ou histona-linker) não foi identificada. Em outros eucariotos, a histona H1, auxilia na compactação e sua ausência poderia levar a um estado menos compactado da cromatina em *T. gondii*. Através de buscas no banco de dados de *T. gondii* (toxodb.org), identificamos uma possível histona H1, similar a H1-like de *Kinetoplastidae*, e que corresponde apenas à porção C-terminal de uma histona H1 típica. Para avaliar se esta proteína possui atividade de histona em *Toxoplasma*, iniciamos a caracterização através do etiquetamento da proteína endógena com etiqueta de HA, uma ferramenta essencial para realização dos ensaios descritos a seguir. Utilizando anticorpos monoclonais anti-HA, foi possível verificar que a TgH1-HA está localizado exclusivamente no núcleo do parasita. No entanto, nos resultados obtidos por Western blot, a proteína mostrou tamanho de 20 kDa, ao invés dos 9 kDa esperados para TgH1 mais a etiqueta de HA, mesmo após tratamento com agentes redutores. As histonas H1, assim como as demais histonas, são alvo de modificações pós traducionais (MPTs) e um grande número de novas MPTs têm sido revelados com a análise de espectrometria de massas. Recentemente foram identificados diversos sítios de ubiquitinação em proteínas de *Toxoplasma*, e a proteína TgH1-like está entre elas, o que levaria a um aumento de tamanho compatível com o encontrado. A ubiquitinação é umas das MPTs comumente encontradas em histonas H1, ainda assim confirmaremos esse dado por análise de espectrometria de massas onde também será verificado se outras modificações ocorrem nesta proteína. Além disso, realizamos um protocolo de extração de histonas por fracionamento celular, onde observamos que TgH1-like precipita com outras histonas, como a H4. Paralelamente, ensaio de coimunoprecipitação, mostrou que a histona H4 precipita juntamente com a TgH1-like, mais um indício da possível função de histona desta proteína. Finalmente, fizemos a predição da estrutura terciária da TgH1-like, através de modelagem por homologia (software Modeller) e verificamos que o potencial eletrostático dessa proteína é



bastante positivo, o que torna muito provável a atração pelas cargas negativas da dupla fita de DNA. Além disso, através do servidor ProFunc, que utiliza a estrutura tridimensional para ajudar a identificar a provável função da proteína, obtivemos correspondência com modelos de histonas, incluindo um modelo teórico de histona h1b. Até o momento, os dados são promissores, embora mais evidências sejam necessárias para corroborar sua função de histona. Para caracterizar completamente TgH1-*like*, estamos atualmente realizando o nocaute gênico e ensaio de imunoprecipitação para análise de espectrometria de massas, o que irá complementar as informações já obtidas, auxiliando a elucidar a função desta proteína em *Toxoplasma*.



103. COMPLEXO NATURAL ALTAMENTE DILUÍDO (M1) ACELERA CICATRIZAÇÃO DA PELE EM CAMUNDONGOS MODULANDO ENZIMAS DE REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR

Viviana Stephanie Costa Gagosian*, Jenifer Pendiuk Gonçalves*, Maria Luiza Ferreira dos Santos, Carolina Camargo de Oliveira.

Laboratório de Células Inflamatórias e Neoplásicas – Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

* ambas as autoras contribuíram de forma equivalente

E-mail: viviana1210@gmail.com; je.p.goncalves@hotmail.com; krokoli@ufpr.br

A pele é o órgão que reveste a superfície do corpo, protegendo contra dessecação e agentes externos. A fim de manter o órgão saudável, caso ocorra uma lesão, esse é reparado em um processo dinâmico denominado cicatrização. O estudo da cicatrização é de extrema importância, pois um dos principais desafios no campo da medicina regenerativa é como aperfeiçoar a regeneração de tecidos no corpo. Sabe-se que a eficácia do processo de cicatrização depende de diversos fatores que podem potencializar a regeneração do tecido, como o microambiente da ferida, o sistema imunológico, a matriz extracelular e citocinas inflamatórias. O complexo natural altamente diluído M1 vem sendo testado e mostrou-se capaz de modificar a resposta imunológica, que é determinante para que a cicatrização ocorra de forma correta e eficaz. O gel de M1 é constituído por *Aconitum napellus* (20dH), *Arsenicum album* (18dH), *Asa foetida* (20dH), *Calcarea carbonica* (16dH), *Chelidonium majus* (20dH), *Cinnamon* (20dH), *Conium maculatum* (17dH), *Echinacea purpurea* (20dH), *Gelsemium sempervirens* (20dH), *Ipecacuanha* (13dH), *Phosphorus* (20dH), *Rhus toxicodendron* (17dH), *Silicea* (20dH), *Sulphur* (24dH) e *Thuja occidentalis* (19dH) em base de carbopol. O M1 e seu veículo foram manipulados e cedidos pela Farmácia Homeoterápica de Curitiba. O objetivo deste trabalho foi estudar a ação do M1 frente ao processo de cicatrização *in vivo*. Para tal, foram utilizados camundongos albinos Suíços, que após anestesia, tiveram o dorso tricotomizado e limpo. O modelo de excisão cutânea foi realizado, obtendo-se duas feridas circulares de 6 mm de diâmetro, com distância de 2 cm uma da outra. Os animais foram alojados em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob o número 694. Os tratamentos com veículo (controle) ou gel de M1 foram aplicados topicamente por 10 dias consecutivos e as lesões foram medidas no momento da excisão e após 3, 7 e 10 dias. Passados 3 ou 10 dias de tratamento, os grupos de animais foram eutanasiados por deslocamento da cervical, e a pele da área de cicatrização foi removida. A pele foi lisada em tampão de extração de proteínas (RIPA) e a expressão proteica analisada através de *western blotting* e imunomarcagem. Foram analisadas as proteínas alfa-actina (α -SMA), envolvida na contração da ferida, e MMPs 2 e 9, relacionadas com o processo de remodelamento tecidual. Os dados obtidos foram submetidos a testes de normalidade e em seguida ao



teste estatístico mais adequado. A análise temporal do fechamento da ferida mostrou que ao final de 10 dias o tratamento com M1 acelerou o processo de cicatrização cutânea dos animais em 30%. Não foi observada diferença na expressão da proteína α -SMA. Porém, após 10 dias de tratamento, os animais tratados apresentaram diminuição de aproximadamente 5 vezes na expressão de MMP-2 e aumento de aproximadamente 4 vezes na expressão de MMP-9, quando comparados aos controles. O complexo M1 mostrou-se promissor, pois aumentou a velocidade de cicatrização, fazendo com que o tecido se regenere mais rapidamente. Além disso, modulou a expressão das enzimas de remodelamento da matriz extracelular de forma que a cicatrização ocorra de forma rápida e eficaz. Concluimos, portanto, que o tratamento tópico com M1 na forma de gel pode auxiliar de forma positiva na cicatrização cutânea.



104. ANALYSIS OF AUTOPHAGY AND APOPTOSIS IN BRAIN CORTEX OF HIGHLY AGGRESSIVE SWISS WEBSTER MICE BY APPLYING THE MODEL OF SPONTANEOUS AGGRESSION (MSA)

Luanda Yanaan Hoppe¹, Thabata Lopes Alberto Duque², Gabriel Melo de Oliveira², Tania Cremonini de Araújo-Jorge¹, Renata Machado Felipe¹, Viviane Muniz da Silva Fragoso¹.

¹ Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, 21045-900, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.

² Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz /FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, 21045-900, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil.

E-mail: viviane.fragoso@ioc.fiocruz.br.

Abstract: Violence and aggression represent a severe social problem, with profound impacts on public health. The MSA developed by our team is based on the behavioral characteristics exhibited by each individual since weaning, at the grouping of animals during childhood, and at their reunification in adulthood. The mitochondria functionality in the brain has a correlation between the presence of stress and the raise of behavior disorders, in our case of interest the highly aggressive behavior. Our group and colleagues has suggested that the analysis of mitochondrial energetic metabolism in brain frontal cortex showed that in highly aggressive individuals there was a decrease in COX activity. This may lead to a decrease in the ATP capacity reserve by oxidative phosphorylation way in the Agg mice, suggest accumulation of reactive oxygen species (ROS) leading to cellular oxidative stress with possible autophagy and death cellular process apoptosis. The aim of this study was evaluate the presence of autophagy and / or apoptosis in the brain of highly aggressive and non-aggressive mice under social stress of regrouping in adulthood. Male mice (n=30) at 3 weeks of age were individually identified and divided into 6 groups of 5 animals each. At the 4th, 6th and 8th week of life, was performed the Tail Suspension Test (TST). At the 10th week of life, except for the mice that were not regrouped (NR), the animals were divided into distinct categories. At the 16th week of life was performed the ethogram and the regrouped animals were individually classified as harmonic (Har), subordinate (Sub) and aggressive (Agg). The animals were euthanized with cervical dislocation, and the cerebral frontal cortex was removed. We analyzed the cellular autophagy processes by immunofluorescence for LC3-II and the cell death by apoptosis by the TUNEL method. The experimental protocol was performed in triplicate and the data were analyzed by One-way analysis of variance (ANOVA) and Kruskal-Wallis post-test, $p \leq 0.05$. The experimental protocol was approved by the Oswaldo Cruz Institute's Ethics Committee on Animal Use (CEUA/IOC) under the license number (005/2015). Under social stress promoted by regrouping, we observed significantly higher number of attacks in aggressive animals relative to all other categories. Lesion extension, a direct consequence of aggressive attacks, revealed that only subordinate mice had marked lesions size, significantly higher than those observed in the other categories. The



evaluation of autophagy showed that there was no increase in the percentage of autophagic cells in the frontal cerebral cortex of Agg mice (21.4%), compared to NR (NR: 16.4%) as observed in the other groups (Har: 56.2%, Sub: 53.9%). However, we observed a significant increase in the percentage of apoptotic cells in all the regrouped categories (Har: 16.5; Sub: 15.4; Agg: 19.2%) in compared to mice not submitted to social stress (NR: 7.9%). The increase in ROS could release the cellular repair factors promoting survival through autophagy. We suggest that because Agg mice have a reduced COX activity, oxidative damage in these animals could be occurring more markedly, so that the mitochondria would be releasing molecules that would directly lead the cells to the apoptotic process.



105. MONTAGEM, ANOTAÇÃO E COMPARAÇÃO DE GENOMAS DE BACTÉRIAS OPORTUNISTAS DO GÊNERO HERBASPIRILLUM ISOLADOS DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA

Willian Klassen de Oliveira¹, Michelle Zibeti Tadra-Sfeir², Rodrigo Cardoso², Emanuel Maltempi de Souza², Fábio de Oliveira Pedrosa², Helisson Faoro^{1,3}.

¹ Laboratório de Bioinformática, Setor de Educação Profissional e Tecnológica, Universidade Federal do Paraná;

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná;

³ Laboratório de Regulação da Expressão Gênica, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR

Herbaspirillum é um gênero da classe beta do filo das Proteobactérias. Algumas espécies deste gênero possuem interesse biotecnológico como potenciais promotores de crescimento de culturas vegetais como milho, arroz e cana-de-açúcar. Elas são capazes de realizar associações endofíticas com essas plantas e converter o nitrogênio atmosférico (N₂) em uma forma utilizável pelas plantas (NH₃), além de secretarem fitohormônios. Entretanto, algumas cepas de Herbaspirillum tem sido isoladas de pacientes imunocomprometidos, levando, por vezes, a desenvolverem bacteremia e óbito. Para compreender como organismos ambientais desse gênero evoluíram para uma variante clínica e os mecanismos moleculares envolvidos neste processo, foram sequenciados os genomas de três cepas clínicas do gênero Herbaspirillum: Herbaspirillum frisingense AU14559, Herbaspirillum linhagem 2 AU13964 e Herbaspirillum linhagem 1 AU14775, isolados de escarro de pacientes com fibrose cística e identificados como pertencentes a este gênero através da sequência do gene rRNA 16S. Os genomas foram sequenciados nas plataformas Illumina MiSeq e Ion Proton. Para realizar a montagem destes genomas foram utilizados os montadores spades, MIRA, MaSurca, Velvet, CLC de novo assembler combinando os dados gerados nas duas plataformas de sequenciamento. O fechamento dos gaps foi realizado através das ferramentas FGAP, consed e o mapeamento gerado pelo CLC para combinar as montagens e encontrar links entre os contigs originais. Após estas etapas os genomas do H. linhagem2 e do H. frisingense AU14559 se encontram fechados, em um contig único, já o genoma do H. linhagem 1 se encontra em 135 contigs. O genoma do H. linhagem 2 ainda apresentou um plamídeo, o qual também se encontra em um contig único. A anotação destes genomas foi realizada através dos algoritmos Prokka e SILVA. Buscas através da ferramenta KAAS e do algoritmo BLAST revelaram diferenças relevantes entre as cepas clínicas e ambientais como a perda do cluster de genes nif, responsável pela fixação biológica de nitrogênio e os genes envolvidos no Sistema de secreção do tipo 3, sistema este utilizado na interação das bactérias com as plantas. Através do algoritmo alien hunter, foram preditas 24 e 32 ilhas genômicas, dentre elas, através da ferramenta GISPY, foram classificadas como



ilhas potencialmente de patogenicidade 5 e 2 ilhas para os organismos H. linhagem2 e H. frisingense AU14559 respectivamente. Foi calculada ainda a identidade nucleotídica média através da ferramenta online ANI Calculator para a determinação da espécie de cada um dos organismos analisados, a qual colocou o H. linhagem 2 dentro da espécie H. seropedicae, o H. linhagem 1 dentro da espécie H. hutiense e confirmou o H. frisingense AU14559 como pertencente a espécie H. frisingense. Estudos e Comparações genômicas adicionais ainda são necessários para uma melhor elucidação da evolução destes organismos de uma forma de vida ambiental para clínica e quais os fatores envolvidos nesta transição.



106. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS COMO FERRAMENTAS PARA O ESTUDO DOS RETROTRANSPÓSONS VIPER E TATE EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Yasmin Carla Ribeiro^{1 2}, Danila Syriani Veluza^{2 3}, Danilo Santos Eugênio^{1 2 4}, Claudemir Souza^{2 4}, Marco Aurélio Krieger^{1 2 4}, Adriana Ludwig^{2 4}

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular - UFPR;

² Laboratório de Genômica Funcional - ICC-Fiocruz/PR;

³ Curso de Biologia – UFPR;

⁴ Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP

E-mail: yacrib@gmail.com; adriludwig@gmail.com

Elementos de transposição (TEs) são segmentos de DNA com capacidade intrínseca de se mover e se replicar dentro do genoma e estão presentes em quase todos os organismos, sendo que nos tripanosomatídeos eles constituem de 2 a 5% do genoma. Os TEs são divididos em dois grupos de acordo com o modo que se transpõe: os retrotransposons, que utilizam uma molécula de RNA como intermediário para transposição, portanto sofrem transcrição reversa; e os transposons, que utilizam DNA como intermediário direto. Os retrotransposons são geralmente classificados em dois grupos: os LTR retrotransposons e os não-LTR retrotransposons, levando em consideração a presença ou ausência de longas repetições terminais. Os LTR retrotransposons são evolutivamente relacionados aos retrovírus e formam uma partícula viral (VLP) onde ocorre a transcrição reversa do elemento. Propostas mais recentes de classificação incluem outras ordens uma vez que novos elementos foram sendo descobertos e se diferenciavam estruturalmente dos demais. Uma outra ordem proposta é a dos elementos DIRS que se diferenciam dos LTR retrotransposons por codificarem uma tirosina recombinase (YR) ao invés de uma integrase (IN) e não possuírem um domínio protease (PR). Além disso, os DIRS não possuem LTRs, mas possuem regiões terminais repetidas. Os DIRS são elementos poucos estudados e, portanto pouco se sabe sobre os seus mecanismos de transposição. Em tripanosomatídeos foram identificados dois elementos dessa ordem, VIPER e TATE, que possuem em sua estrutura um gene que, a princípio, codifica uma proteína GAG-like, um gene que codifica uma YR e um gene que codifica uma proteína com domínio transcriptase reversa (RT) e RNaseH (RH). Várias ferramentas podem ser utilizadas para auxiliar no entendimento desses retrotransposons, como a produção de anticorpos para análises de imunolocalização por microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão. Isso nos ajudará a compreender os mecanismos de ação das proteínas e investigar a possível formação de VLPs. Dessa forma, nosso trabalho tem como objetivo produzir anticorpos policlonais contra as proteínas expressas pelos elementos VIPER e TATE. Primeiramente os genes das três ORFs de VIPER foram clonados em vetores de expressão pDEST17, que possui etiqueta 6-his N-terminal possibilitando a posterior purificação. Os primeiros testes de expressão foram



realizados na cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star com diferentes temperaturas de indução. Os primeiros testes para GAG-like mostraram um bom rendimento na fração insolúvel quando expresso à 15°C por 16 horas. Já, para a RT, a melhor condição foi na fração insolúvel à 37°C por 4 horas, apesar do baixo rendimento, que pode estar relacionado a possível toxicidade da proteína para a bactéria. O resultado de *western blot* apresenta bandas compatíveis com uma possível degradação da proteína. Ainda não foram realizados os testes de expressão da YR, porém por ser uma recombinase também pode apresentar toxicidade à bactéria. Iremos realizar um ensaio de toxicidade durante diferentes tempos de expressão, acompanhando a morte celular pela densidade óptica. Após realizarmos a padronização das melhores condições de expressão para cada uma das proteínas, testaremos os protocolos de solubilização de corpos de inclusão e purificação. Para o elemento TATE *primers* estão sendo desenhados para a amplificação das ORFs completas e parciais e a estratégia de expressão será baseada nos resultados obtidos para o elemento VIPER. Após a purificação e caracterização dessas proteínas recombinantes, elas serão inoculadas em camundongos (licença LW15/13) para obtenção dos anticorpos policlonais. A produção dessas proteínas e dos seus respectivos anticorpos será uma valiosa ferramenta para a caracterização desses elementos e entendimento do mecanismo de transposição dos elementos DIRS.

Fonte Financiadora: CAPES, CNPq e Fiocruz.



107. TATE: UM RETROTRANSPONON SOBREVIVENTE NOS GENOMAS DE TRIPANOSOMATÍDEOS

Yasmin Carla Ribeiro^{1 2}, Marco Aurélio Krieger^{1 2 3}, Adriana Ludwig^{2 3}.

¹ Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular - UFPR

² Laboratório de Genômica Funcional – Instituto Carlos Chagas-FIOCRUZ/PR

³ Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP

E-mail: yacrib@gmail.com; adriludwig@gmail.com

Tripanosomatídeos são protozoários flagelados e algumas espécies são conhecidas por causarem doenças negligenciadas que afetam principalmente as Américas e África, como o *Trypanosoma cruzi* causador da doença de Chagas, *T. brucei* causador da doença do sono e *Leishmania* sp que causam os diferentes quadros de leishmaniose. Durante o sequenciamento e montagem dos genomas de tripanosomatídeos, notou-se que cerca de 2 a 5% do genoma haploide desses protozoários é composto por elementos de transposição, sendo encontrado apenas retrotransposons que se transpõem através de intermediário de RNA. Elementos de transposição são componentes móveis presentes nos genomas de eucariotos capazes de se multiplicar e se integrar no genoma auxiliando na variabilidade genética o que contribui para a evolução e adaptação das espécies. Poucos elementos foram descritos em tripanosomatídeos, podendo ser agrupados em quatro famílias: CRE-like, VIPER-like, TATE-like e Ingi-like. O elemento TATE (*telomeric associated transposable element*) foi descoberto em *L. braziliensis* e é um retrotransposon do grupo DIRS, o qual ainda é pouco estudado. Os elementos DIRS codificam uma provável GAG-like, uma transcriptase reversa para realizar a transcrição reversa da sequência de RNA a ser transposta, e uma tirosina recombinase que está associada com a integração do elemento no sítio-alvo. Como não existe uma caracterização básica do elemento TATE, o objetivo deste trabalho é compreender a estrutura do elemento e sua distribuição e conservação em tripanosomatídeos. Além disso, será realizada uma análise filogenética incluindo vários elementos DIRS para compreender a origem e evolução desses elementos. Para verificar a estrutura do elemento TATE, foram analisadas 15 cópias do genoma de *L. braziliensis* obtidas através de BLASTp. Uma das características dos elementos DIRS é apresentar regiões de repetição nas extremidades o que, a princípio, não foi encontrado nas cópias analisadas. Verificou-se a existência de três ORFs (pelo ORFfinder, NCBI) na maioria das cópias. A presença de domínios conservados foi verificada pelo CD-search do NCBI. A ORF1 não apresentou nenhum domínio conservado, nenhuma similaridade com outras proteínas do GenBank e também não possui o motivo CH-box, região de ligação a ácidos nucleicos presente na proteína GAG-like de outros DIRS. A ORF2, além de estar conservada nas cópias, apresenta um domínio de uma tirosina recombinase. Um fato intrigante encontrado foi a presença de um domínio adicional na ORF2, SPOR



envolvido com ligação a peptídeoglicanos ou KAR9 encontrado em proteínas de citoesqueleto. A ORF3 apresenta-se bem conservada nas cópias do genoma de *L. braziliensis* e codifica o domínio transcriptase reversa e peptidase_A17, que corresponde a uma RNaseH. Também foram analisados genomas de outras espécies de tripanosomatídeos em busca de cópias do retrotransposon TATE através de BLASTp e tBLASTn (TritrypDB e NCBI), usando um *cut-off* de *e-value* $\geq 10^{-10}$. Foram encontradas cópias completas e/ou degeneradas nos genomas da maioria das espécies de *Leishmania*, *Blechnomonas ayalai*, *Endotrypanum monterogeii*, *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas pyrrocoris*, *Angomonas deanei* e *Strigomonas culicis*. Também foi encontrado em *Bodo saltans*, um protozoário da ordem Kinetoplastida relacionado filogeneticamente aos tripanosomatídeos. Isso indica que o elemento TATE já estava presente no ancestral dos tripanosomatídeos e tem sido mantido por mais de 300 milhões de anos no genoma de algumas espécies, podendo ainda estar ativo. Futuras análises filogenéticas ajudarão a compreender a história evolutiva do elemento e sua relação com os outros elementos DIRS, contribuindo para o entendimento do impacto dos elementos de transposição em tripanosomatídeos.

Fonte Financiadora: CAPES, CNPq e Fiocruz.



108. IDENTIFICAÇÃO DE FOSFOPROTEÍNAS REGULADORAS DO PROCESSO DE METACICLOGÊNESE EM *Trypanosoma cruzi*

Yirys Díaz Olmos, Michel Batista, Fabricio K Marchini

Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR

E-mail: yirysdiaz@gmail.com

A fosforilação de proteínas é uma modificação pós-traducional envolvida na regulação da função de proteínas. A partir da publicação do genoma dos três tripanosomatídeos patogênicos (*T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major*) no ano 2005, várias hipóteses têm sido sugeridas. Realizando a análise do kinoma e fosfatoma nesses tripanosomatídeos foi descoberto que seus genomas codificam para um relativo alto número de proteínas quinases e fosfatases. Essa informação poderia sugerir que a fosforilação de proteínas é uma modificação pós-traducional que participa como um importante mecanismo regulador de diversos processos celulares, dentre eles, as diferenciações durante o ciclo de vida de *T. cruzi*, organismo em que a regulação da expressão gênica acontece principalmente a nível pos-transcricional. Portanto, esse estudo tem como finalidade caracterizar 10 fosfoproteínas de *T. cruzi* e determinar a participação de sítios de fosforilação específicos que em um trabalho do nosso grupo apresentaram intensidades significativamente moduladas durante a metaciclogênese *in vitro* e que poderiam estar envolvidos na diferenciação de *T. cruzi* à forma infectiva. As sequências dos genes que codificam as proteínas a caracterizar foram clonadas em vetores construídos para expressão em *T. cruzi* de proteínas fusionadas a GFP no N e C-terminal. Parasitas com expressão episomal das proteínas recombinantes foram obtidos por transfecção e a localização celular das proteínas foi determinada usando imunofluorescência indireta. *Cryomilling* celular com subsequente purificação por afinidade será usado para determinar os parceiros associados as proteínas, cuja identificação será realizada por espectrometria de massas. Nocaute gênico será realizado por recombinação homologa usando as regiões 5' e 3' dos genes e será determinado o efeito da deleção gênica no processo de metaciclogênese. A participação dos sítios de fosforilação como moduladores da função das proteínas será estudada gerando mutações específicas dos sítios por PCR de fusão. A análise por meio de imunofluorescência indireta da localização subcelular das proteínas fusionadas a GFP mostrou para a proteína hipotética V5BVD3 uma localização na parte anterior de epimastigotas do parasita. As outras proteínas apresentaram localização dispersa no citoplasma. É esperado que por meio da caracterização funcional dessas proteínas possa ser originada informação básica sobre importantes redes de sinalização que *T. cruzi* ativa na metaciclogênese.



109. POLYMORPHISM IN INSULIN GENE (rs689) IN ADULTS EURO-BRAZILIAN WITH TYPE 1 DIABETES

Yusra Al-Lahham, Marciane Welter, Ana Karla Bittencourt Mendes, Dayane Alberton, Fabiane Gomes de Moraes Rego, Glaucio Valdameri, Geraldo Picheth

Post-graduation in Pharmaceutical Science, Federal University of Parana, Brazil

E-mail: yusra.lahham@gmail.com

Introduction. Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease resulting from the destruction of beta cells and cause insulin deficiency, hyperglycemia and long-term complications such as neuropathy, retinopathy and kidney failures. T1D accounts for about 5–10% of all cases of diabetes; however, its incidence continues to increase worldwide. The disorder has a strong genetic component. T1D is associated with several genetic loci. Among these, the insulin gene polymorphisms is a target of interest with strong association with the disease. The insulin (INS) gene is responsible for the insulin from the pancreatic beta cells. Insulin gene is located chromosome 11 (11p15.5; OMIM 176730) and show three exons and two introns. The rs689 (T>A) is located in intron 1 and it was associated with T1D in other populations. The aim of the study is associate the genotype and allele frequencies of rs689 with T1D and health subjects, all adults and Euro-Brazilians. The Ethical Committee approved the project (CAAE 01038112.0.0000.0102). **Methodology.** A sample 281 adults subjects, classified as T1D (n=136) and healthy (control group, n=145) using de American Diabetes Association 2017 criteria. The groups were matched by gender and age. Genotyping for rs689 was performed with TaqMan® (Applied Biosystems, code C_1223317_10) specific fluorescence probes in real-time PCR (7500 Fast™, Applied Biosystems). **Results and Discussion.** All groups were in Hardy-Weinberg equilibrium. The genotype frequencies (%) for Controls and T1D groups, respectively, were and TT (53.5) / TA (36.1) / AA (10.4) and TT (48.5) / TA (44.1) / AA (7.4), with a P-value 0.334 (chi-square). Minor allele (A-allele) frequencies (MAF, % and 95%CI) were 28.5 [23-34] and 29.4 [24-35], respectively for controls and T1D groups (P=0.806). The MAF for rs689 observed in our study is similar to other Caucasian populations but comparing to Oriental and African population the MAF for rs689 was different. At our knowledge, this study is the first to approach the rs689 in Brazilian population. **Conclusion.** The polymorphism rs689 in insulin gene is not associated with adult type 1 diabetes in Euro-Brazilian population studied.

Financial Support: Araucaria Foundation, CNPq