



V SEMANA DE
PÓS-GRADUAÇÃO
DE BIOQUÍMICA MÉDICA

SESSÃO DE PÔSTER

Segunda-feira (19/09)

LEGENDA:

BMV - Bioquímica de Microorganismos e Vírus | **BM** - Bioenergética e Membranas | **BF** - Bioquímica de Processos Homeostáticos e Fármacos | **BI** - Bioquímica de Insetos | **BE** - Bioquímica Estrutural | **BC** - Biologia Celular

O PAPEL DA PROTEÍNA GRASP NA SECREÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E VIRULÊNCIA DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

Luna S. Joffe^{3,6}, Lívia Kmetzsch¹, Charley C. Staats^{1,2}, Caroline Luiza Ramos³, Kildare Miranda, Débora L. de Oliveira³, Radames J. B. Cordero⁴, Arturo Casadevall^{4,5}, Leonardo Nimrichter³, Augusto Schrank^{1,2}, Marilene H. Vainstein^{1,2} e Marcio L. Rodrigues³

¹*Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil,*

²*Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil,*

³*Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil,*

⁴*Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Ave, Bronx, NY, USA,*

⁵*Division of Infectious Diseases of the Department of Medicine, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Ave, Bronx, NY, USA,*

⁶*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.*

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada e agente etiológico da criptococose. Para que essa doença se estabeleça no hospedeiro, é necessária a secreção de fatores de virulência para o ambiente extracelular. Dentre esses fatores de virulência, destaca-se a secreção do polissacarídeo capsular majoritário, glucuronoxilomanana (GXM). A GXM é sintetizada no ambiente intracelular e secretada através de vesículas para o espaço extracelular para que ocorra o crescimento distal da cápsula. Sabe-se que a proteína GRASP (proteína de re-organização e compactação do Golgi) está envolvida em mecanismos não-convencionais de secreção de proteínas em células eucariotas. Entretanto, seu papel na secreção de polissacarídeos ainda é desconhecido. Com o intuito de elucidar o papel dessa proteína no processo secretório em *C. neoformans*, utilizamos uma cepa de *C. neoformans* mutada no gene codante para nessa proteína e sua cepa selvagem correspondente. Foram realizados ensaios de fagocitose com células de linhagem RAW os quais demonstraram que o mutante é mais eficientemente internalizado em relação ao selvagem. Além disso, ensaios in vivo demonstraram que o mutante é hipovirulento em infecção murina. Por microscopia eletrônica de varredura, observamos que o mutante possui um fenótipo hipocapsulado quando comparado com a cepa selvagem. Observamos também que, em comparação com células selvagens, o aparato de Golgi das células mutantes parece estar compactado e restrito a áreas reduzidas do citoplasma. Ambas as cepas produziram vesículas extracelulares em quantidades comparáveis. Os mutantes, entretanto, produziram vesículas com concentrações diminutas de GXM. Esses resultados sugerem que a proteína GRASP, descrita como importante regulador da secreção não convencional de proteínas parece estar envolvida na virulência e secreção de polissacarídeos em *C. neoformans*.

BMV04

EFEITO DE ALTAS PRESSÕES HIDROSTÁTICAS SOBRE AS PROTEÍNAS DE PAREDE CELULAR DA LEVEDURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Nascimento, V. L., Henrique, M.F., Schuartz, C.D.V. e Fernandes, P.M.B.

Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

As leveduras são organismos unicelulares sésseis, sensíveis as grandes alterações ambientais. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo fundamental na fermentação alcoólica e, portanto, de grande interesse industrial. Para conseguir sobreviver às variações ambientais possuem diversas maneiras de ajustar rapidamente seu metabolismo. O estresse causado por alta pressão hidrostática (HHP) promove alterações fisiológicas e morfológicas. Os mecanismos celulares utilizados para compensar seu efeito estão sob forte investigação pela grande importância biotecnológica que a aplicação da HHP tem recebido. Sendo a parede celular um dos alvos primários da HHP, a mesma merece específica e significativa atenção. Neste trabalho foi realizada uma análise da expressão diferencial das proteínas de parede celular (PPC) em *S. cerevisiae* na resposta ao estresse de HHP (50 e 100 MPa). Foram utilizadas inicialmente duas metodologias para extração das PPC, comparando os tampões acetato 0,5M pH 6,0, com inibidores de proteases, e Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, com 1,25 mM de EDTA e inibidores de proteases, seguido de incubação em solução alcalina (30 mM NaOH) por 18 h. Além disso, foram comparadas duas metodologias de separação e caracterização das PPC por eletroforese unidimensional: (1) 12% SDS-PAGE; e (2) 16% TRICINA-SDS-PAGE. As proteínas extraídas em tampão Tris-HCl apresentaram uma boa resolução na separação por eletroforese. Entretanto, não foi possível visualização de bandas nos géis das proteínas extraídas com tampão acetato. Mais ainda, foi possível detectar a diferença de expressão das PPC, tendo sido esta mais nítida na separação por TRICINA-SDS-PAGE. Dessa forma, estabeleceu-se uma metodologia eficiente para extração de PPC de *S. cerevisiae* e detecção de expressão diferencial destas proteínas utilizando SDS-PAGE e TRICINA-SDS-PAGE.

ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INFECTADAS COM UM VÍRUS EMERGENTE

Cavalheiro, M.G.¹, Assunção-Miranda, I.² e Da Poian, A.T.¹

¹Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil,

²Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Muitos vírus são responsáveis por causar inflamação aguda ou crônica das articulações. Os membros do gênero Alphavirus são associados a epidemias de poliartrite/artralgia em humanos, dentre eles o Mayaro (MAYV), endêmico de regiões rurais da América do Sul. As bases moleculares e celulares da patogênese da artrite induzida por alfavírus são pouco entendidas, no entanto, alguns estudos demonstraram que a artrite viral inicia-se após a replicação do vírus promover a formação de um infiltrado de células relacionadas à resposta inflamatória e a secreção de vários mediadores inflamatórios. Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi avaliar se macrófagos são células alvo da infecção e replicação pelo MAYV, liberando citocinas envolvidas no controle da replicação e na regulação das respostas celulares após a infecção. Culturas primárias de macrófagos de camundongo obtidas do lavado peritoneal após inflamação induzida por tioglicolato foram infectadas com MOI de 5 por 1h e após 0, 16, 24 e 48 h de infecção os meios de cultura foram coletados para análises. A replicação foi avaliada através de quantificação das partículas virais por ensaio de plaque em células BHK-21. A concentração de citocinas liberadas foi mensurada por ELISA e a viabilidade celular determinada pelo método do MTT. Partículas virais foram detectadas após os tempos de 0 a 24 h, no entanto, após 48 h de infecção o título viral diminuiu levemente. Houve redução na viabilidade celular (ca. 80%) em relação às células controle (não infectadas), em todos os tempos analisados. A infecção promoveu a ativação de macrófagos induzindo a secreção de TNF- α e IL-6 após 16 e 24 h em relação às células não infectadas, contudo, após 48 h houve leve redução na concentração de ambas citocinas. Os resultados obtidos mostraram que MAYV foi capaz de infectar os macrófagos induzindo nestes a secreção de citocinas relacionadas à artrite.

BM01

EFEITO DOS HORMÔNIOS TIREOIDIANOS NA ATIVIDADE E DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR DA HEXOCINASE DE TECIDOS DE ROEDORES

Pecanha, F.L.M.¹, dos Santos, R. S.¹, Trevenzoli, I.H.² e da Silva, W.S.¹

¹Instituto de Bioquímica Médica,

²Instituto de Física Carlos Chagas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os hormônios tireoídianos, T3 e T4, são muito importantes no metabolismo do nosso organismo, participando da regulação do gasto energético. A hexocinase (HK) é uma enzima importante no consumo da glicose, sendo responsável pela primeira etapa da via, catalisando a conversão de glicose em glicose 6-fosfato. Nossos resultados, em camundongos, mostraram um aumento da atividade da hexocinase mitocondrial (HKmit) em músculo solear, gastrocnêmio e cardíaco de animais hipertireoídicos. O objetivo do nosso trabalho foi investigar se o mesmo ocorre em ratos e possíveis mecanismos envolvidos na regulação da enzima. Ratos machos wistar foram divididos em 3 grupos e tratados como descrito a seguir: hipotireoideio – receberam 0,03% (g/v) de metimazol na água de beber durante 21 dias; hipertireoideio – injeções (ip) 0,1 μ g T4/g de massa corporal durante 10 dias; eutireoideio – veículo. Em ratos, observamos um aumento da razão entre a massa cardíaca e a massa corporal no grupo hipertireoideio, assim como um aumento nos níveis séricos de T4. Além disso, foi visto um aumento da atividade da HKmit no músculo solear e coração, como descrito em camundongos. No músculo gastrocnêmio não foi possível detectar a atividade da HKmit em nenhum dos grupos analisados. Ensaio do efeito direto do T3 na HK mostraram que ele não é capaz de alterar a atividade da enzima. Por outro lado, não foi observado nenhuma alteração dos níveis de expressão da HKmit após o tratamento, sugerindo um mecanismo de regulação pós-traducional da HK.

ALTERAÇÕES NA HOMEOSTASE DE GLICOSE E ENZIMAS GLICOLITICAS INDUZIDAS POR DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO

Ferreira, V.S., dos Santos, R.S. e da Silva, W.S.

Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil

Os dextrans constituem uma classe de polímeros capazes de induzir colite e estresse do retículo endoplasmático (ERE) em animais. A colite é uma doença intestinal caracterizada por uma resposta imune/inflamatória, com um aumento anormal na expressão de citocinas pró-inflamatórias. O ERE é caracterizado pelo acúmulo de proteínas sintetizadas e mal enoveladas nesta organela e pode ser induzido por infecções e drogas, como o Dextran Sulfato de Sódio (DSS). Este trabalho tem por objetivo verificar se o DSS é capaz de gerar alterações no metabolismo de glicose. Para isso, camundongos foram tratados com DSS de 36-50 KDa (3 ou 5% m/v) por 7 dias, nos quais foram avaliados alguns parâmetros característicos da colite, como comprimento do cólon e sangramento retal, foram feitos testes de tolerância à glicose (TTG), medição das atividades das enzimas hexoquinase (HK), glicoquinase (GK) e lactato desidrogenase (LDH) em frações citosólica e mitocondrial de diversos tecidos. No primeiro tratamento, com DSS 5% m/v, observou-se um ligeiro aumento na curva do TTG, diminuição no comprimento do cólon, sangramento retal e nenhuma alteração nas atividades enzimáticas no fígado, pâncreas, coração ou cérebro. No segundo, com DSS 3% m/v, foi possível observar um aumento na curva do TTG, diminuição da atividade de HK na fração mitocondrial do intestino e aumento da atividade de GK na fração citosólica do pâncreas e fígado. Estes resultados sugerem que o DSS pode interferir com a ação da insulina e que seus efeitos sobre a atividade das enzimas é tecido específico. **Financiado por:** FAPERJ, PRONEX e CNPq.

ALTERAÇÕES METABÓLICAS NO MUSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO ADIPOSITO MARROM DE FÊMEAS WISTAR OVARIECTOMIZADAS

Nigro, M.¹, Santos, A.T.¹, Ketzer, L.A.¹, Schweizer, F.M.¹, Barthem, C.¹, Albuquerque, J.P.A.², Baldanza, M.R.³, Carvalho, D.P.² e de Meis, L.¹¹Instituto de Bioquímica Médica,²Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,³Escola de Educação Física e Desportos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

A queda na produção dos hormônios sexuais femininos na menopausa pode provocar aumento da adiposidade visceral e redução da massa muscular e da força específica de contração. A ovariectomia é um procedimento cirúrgico que mimetiza uma condição de pós-menopausa. Sabe-se que animais ovariectomizados apresentam uma redução na taxa metabólica, porém os mecanismos moleculares envolvidos não são bem compreendidos. O objetivo do presente trabalho, portanto, foi avaliar as possíveis causas para as diferenças na taxa metabólica e função muscular em ratas ovariectomizadas. Fêmeas Wistar pesando aproximadamente 200g foram divididas em dois grupos: falso-operadas (sham) e ovariectomizadas (ovx) e sacrificadas em 21 dias ou 13 dias após a cirurgia. Ao décimo dia do protocolo de 13 dias, os animais foram divididos em dois sub-grupos: fêmeas mantidas em 22°C ou expostas à 4°C durante 3 dias. No protocolo de 21 dias, o peso corporal foi significativamente superior no grupo Ovx (30.6±2.6g; n=10) comparado ao Sham (14.9±3.1g; n=10), apesar de não terem sido observadas diferenças na ingestão de ração. A expressão de UCP1, uma proteína mitocondrial importante para a termogênese no tecido adiposo marrom (BAT) não diferiu entre os grupos. O mesmo resultado foi observado para a SERCA 1a, enzima envolvida no relaxamento muscular e na produção de calor. No protocolo de 13 dias, ambos os grupos foram capazes de manter a temperatura corporal quando expostos ao frio. As diferenças no peso entre Sham e Ovx persistiram. Apesar das diferenças no ganho de peso, o consumo de oxigênio e o calor liberado por mitocôndrias isoladas de BAT foram similares nos dois grupos mantidos à 22°C. A exposição ao frio promoveu um aumento nestes parâmetros em ambos os grupos. Estes dados sugerem que o aumento de ganho de peso induzido por pela ovariectomia não pode ser explicado por um decréscimo na termogênese do BAT.

ALTERAÇÕES NO METABOLISMO ENERGÉTICO E REDOX DE CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DISPARADAS POR PRODUTOS DERIVADOS DO SANGUE

Ana Paula M. Mendonça e Marcus F. Oliveira

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

O Acidente Vascular Cerebral hemorrágico (AVCh) representa um dos acometimentos no Sistema Nervoso Central (SNC) de maior severidade e, é considerada a 3ª maior causa de morte no mundo, com múltiplas consequências tais como danos cognitivos e motores permanentes aos pacientes. O dano tecidual causado pelo AVCh é iniciado quando ocorre o rompimento da barreira hematoencefálica e o extravasamento do conteúdo sanguíneo, fazendo com que o parênquima cerebral seja exposto a uma grande quantidade de células do sangue contendo hemoglobina, heme e ferro. Estas moléculas são potentes agentes pró-oxidantes e neurotóxicas, podendo acarretar em morte celular, caso estas não sejam devidamente metabolizadas. É nesse contexto que este trabalho busca avaliar alterações no metabolismo energético e redox de células do SNC expostas ao ferro, ao heme e a hemoglobina, já que, dados na literatura mostram que, em relação a neurônios, astrócitos possuem maior resistência à toxicidade induzida pelo ferro e hemoglobina. Nosso modelo experimental consiste em uma linhagem tumoral (U-87) um glioblastoma cultivado em meio DMEM - F12 (10% DE SFB). A abordagem experimental se baseia em incubações de 24 horas na presença de ferro, hemoglobina e heme (1, 5, 10 e 50µM). Feito isso, verificamos a viabilidade celular por ensaio de MTT, ensaio de extravasamento da enzima lactato desidrogenase (LDH) e exclusão do corante azul de tripan. Nossos dados mostram que essas células possuem viabilidade de 100% até 50µM de concentração de ferro, heme e hemoglobina, mostrando que a U-87 é resistente ao dano oxidativo sofrido. Além disso, verificamos o nível de peroxidação lipídica dessas células na presença de ferro 10µM e 50µM de ferro por 24h através do método de TBARS. Observamos que, a medida que a concentração de ferro presente no meio aumenta, há maior peroxidação lipídica da U-87. Isso nos permite concluir que o dano oxidativo dessas células aumenta de acordo com a concentração de ferro no meio. Por fim, essas mesmas células incubadas por 24h com 50µM de ferro, foram submetidas a respirometria. Esse resultado mostra que a U-87 possui uma redução no consumo de oxigênio, inferindo que há uma disfunção mitocondrial nessas células em que o metabolismo das mesmas é diminuído.

BF01

EFEITOS DA CICLOSPORINA A NA EXTINÇÃO DE CURTO E LONGO PRAZO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS EM CAMUNDONGOS

Almeida, S., Moulin, T.C., Tubenclak, F. e Amaral, O.B.

Instituto de Bioquímica Médica - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ

Diversos estudos têm comprovado que as memórias não são estáticas após sua consolidação, podendo sofrer mudanças através de processos como a extinção. Este fenômeno é caracterizado pela diminuição gradual de uma resposta condicionada quando o contexto ou estímulo condicionado é apresentado na ausência do estímulo incondicionado. A proteína fosfatase calcineurina (CaN) tem sido proposta como uma enzima importante para este processo, mas as descrições de seu papel no aprendizado inicial do condicionamento aversivo e em sua extinção são controversas, o que pode dever-se a um papel diferencial desta enzima em diferentes componentes destes fenômenos. Assim, o presente estudo investigou o efeito do bloqueio farmacológico da CaN por seu inibidor ciclosporina A (CsA) sobre diferentes protocolos de extinção da tarefa de medo condicionado contextual em camundongos. A administração sistêmica de CsA (20mg/kg) 1h antes da reexposição ao contexto bloqueou a extinção ao longo de uma sessão de extinção de 30 min, porém não preveniu a formação de uma memória de extinção de longa duração, como observado num teste 24 h depois. Resultados semelhantes foram obtidos quando a extinção foi dividida em múltiplas sessões diárias curtas. A administração intracerebroventricular (ICV) de CsA (5 µg) também levou a um aumento significativo da resposta condicionada nos minutos finais da sessão de extinção em relação ao grupo controle. Estes dados demonstram que a CaN é importante na aquisição de curto prazo da memória de extinção, mas que sua atividade não parece influenciar a aquisição a longo prazo, testada 24 h após. Isto sugere que a extinção de memórias aversivas pode contar com componentes paralelos sustentados por sistemas bioquímicos distintos: um dependente de calcineurina (possivelmente envolvido com a labilização de alterações sinápticas existentes) e outro independente (possivelmente envolvido com a formação de uma nova associação que se sobrepõe à original).

BI01

ESTUDO DO PAPEL DE PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASES NA CABEÇA DO MOSQUITO AEDES AEGYPTI APÓS DIFERENTES TIPOS DE ALIMENTAÇÃO

Daumas E., Willy Jablonka e Mário Alberto C. Silva-Neto

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

O mosquito *Aedes aegypti* é vetor de doenças como febre amarela e dengue. Endêmico em zonas tropicais e subtropicais estima-se que, somente para dengue, cerca de 50 a 100 milhões de casos ocorram por ano mundialmente (Whitehorn e Farrar, 2010). Neste trabalho, estudamos a expressão de Proteínas tirosina fosfatases (PTPs) no mosquito, proteínas importantes no controle do crescimento e diferenciação celular e outros processos como metabolismo energético e imunidade. Aqui, analisamos a expressão de PTPs na cabeça do mosquito *Aedes aegypti*, a fim de identificar possíveis PTPs que estejam envolvidas no controle da visão, olfato, ingestão sanguínea e produção de neurohormônios. Dados iniciais mostram que tanto a cabeça quanto o intestino do mosquito aumentam a expressão de PTPs após a alimentação com sangue, concomitante a um aumento da expressão de um peptídeo microbicida (defensina). Juntos, estes dados sugerem uma comunicação entre o sistema nervoso, digestivo e imune a partir da regulação da expressão de proteínas tirosina fosfatases no mosquito *Aedes aegypti*.

BI02

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE RPACBP-1 POR AMINOÁCIDOS DA ALIMENTAÇÃO EM RHODNIUS PROLIXUS

Majerowicz, D.¹, De Paula, I.F.¹, Grillo, L.A.M.^{1,2} e Gondim, K.C.^{1,3}

¹*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil,*

²*Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Brasil,*

³*Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Brasil.*

As proteínas ligadoras de acil-CoA, ou ACBPs (do inglês, Acyl-CoA-binding protein) constituem uma família de proteínas que possuem um domínio conservado capaz de ligar acil-CoA graxo de cadeia média e longa com uma alta afinidade e especificidade. O gene que codifica a RpACBP-1 é altamente expresso no intestino médio posterior e é regulado logo após alimentação pela liberação de serotonina na hemolinfa, e essa proteína deve estar envolvida na absorção de lipídeos provenientes da alimentação. Porém, esse hormônio não deve ser o único regulador da expressão desse gene. A alimentação artificial dos insetos com solução salina foi capaz de aumentar expressão do RpACBP-1, mas não ao mesmo nível dos animais alimentados com sangue, indicando que algum componente do sangue é importante para a indução da expressão desse gene. A complementação da solução salina com albumina induziu um aumento de expressão comparável à alimentação com sangue. Além disso, a alimentação com glicina ou lisina, mas não glutamina, teve o mesmo efeito da alimentação com albumina, mostrando que a porção proteica do sangue é um regulador da expressão de RpACBP-1. A injeção de quantidades acima de 50 fmol de rapamicina foi capaz de inibir a indução da expressão do gene RpACBP-1, mostrando um envolvimento da TOR na via de sinalização. Por último, a expressão gênica do fator de transcrição RpFoxA2, que possui um sítio de ligação predito no promotor de RpACBP-1, foi reduzida em ~75% após a alimentação. Esses resultados podem indicar uma relação entre os aminoácidos vindos da alimentação, ativação da proteína TOR, inibição da expressão de RpFoxA2 e o aumento da expressão de RpACBP-1, embora mais experimentos sejam necessários para comprovar essa hipótese.

BI03

SILENCIAMENTO GÊNICO DE RHODNIUS PROLIXUS POR INGESTÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE DSRNA

Taracena, M.L.¹, Paiva-Silva, G.O.¹, Oliveira, P.L.¹ e Pennington, P.²

¹Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil,

²Centro de Biotecnologia, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala, Guatemala.

O inseto *Rhodnius prolixus* é um importante vetor da doença de Chagas e um sistema modelo para o estudo de fisiologia de insetos hematófagos. A interferência de RNA (RNAi) por médio de RNA de dupla fita (dsRNA) é uma das ferramentas mais utilizadas para estudar a função dos genes e seus produtos no metabolismo celular. A injeção de dsRNA tem alcançado silenciamentos efetivos para vários genes em *R. prolixus* e nesse trabalho foi desenvolvido um protocolo que permitisse a administração do dsRNA por meio de ingestão de sangue com bactérias produtoras de dsRNA. Os alvos testados são moléculas de importância no metabolismo redox do *R. prolixus*. A proteína ligadora de heme de *Rhodnius* (RHBP), expressa no corpo gorduroso, liga o heme liberado na digestão e possui um papel importante na ovogênese. A catalase, expressa em diferentes tecidos, catalisa a quebra de peróxido de hidrogênio e assim livra a célula de dano oxidativo gerado por EROs. Com a ingestão de bactéria produtora de RHBP dsRNA foi observada a especificidade do método; determinou-se uma dose ótima de bactéria para alimentar; observou-se uma inibição de 99.6% da expressão do gene três dias após alimentação e uma redução de 46% no número total de ovos por fêmea. Com a catalase, foi possível observar silenciamento (até 95%) em diferentes tecidos: corpo gorduroso, ovário, intestino posterior e anterior. Esse silenciamento na expressão de RNAm foi acompanhado por uma queda significativa da quantidade de ovos, e incremento no dano oxidativo nos tecidos. O trabalho mostra que a ingestão de bactéria com dsRNA produz silenciamento em mais de um tecido por vez, em genes com diferentes cinéticas e padrão de expressão. Nossa proposta é que esta técnica pode representar um potencial método de controle do vetor no campo ou ferramenta para o estudo de função de proteínas.

BI04

CARACTERIZAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO MAF E A REGULAÇÃO DA SUA EXPRESSÃO EM RESPOSTA A HEME E DESAFIOS OXIDATIVOS EM AEDS AEGYPTI, VETOR DA DENGUE

Lucas Machado C. Brouck e Gabriela de O. Paiva-Silva

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

As Mafs são proteínas de grande importância para as vias de detoxificação de espécies reativas de oxigênio, pois são adaptadoras de alguns fatores transcricionais ligados a estresse oxidativo. Quando esses fatores transcricionais são translocados para o núcleo, eles se ligam às Mafs e então, conseguem se ligar ao DNA permitindo a transcrição. Como o *Aedes aegypti* se alimenta com grandes quantidades de sangue e isso representa um grande desafio oxidativo, supomos que a indução da expressão gênica de proteínas antioxidantes por estresse oxidativo seja por via das Mafs. O objetivo do projeto é a caracterização das Mafs e da regulação da sua expressão em resposta a desafios oxidativos foi realizada em *A. aegypti*, vetor da dengue. Utilizou-se primers desenhados para uma sequência homóloga aos genes das Mafs de *Drosophila* em *A. aegypti* para verificarmos a existência e a expressão dessa proteína no intestino médio dos mosquitos alimentados com sangue, sangue suplementado de paraquat com e sem antioxidantes ou com solução de sacarose e em células Aag2 tratadas com Heme e/ou paraquat, pelo método de PCR de cDNA. Para a quantificação dessa expressão foi usado o método de Real-Time PCR. Com isso verificou-se que in vivo a expressão da Maf é regulada positivamente quando os mosquitos são alimentados com sangue em relação ao controle e que os antioxidantes diminuem a expressão dessa proteína. E também houve modulação da expressão de Maf com os tratamentos em células Aag2, mostrando que Heme e paraquat também regulam a expressão dessa proteína in vitro.

BE02

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS DA PROTEÍNA CAPSÍDICA DO VÍRUS DA HEPATITE C COM MODELOS DE MEMBRANA E ÁCIDOS NUCLEICOS

Braga, V.L.A.¹, Mendes-Silva, A.¹, Ferreira, D.F.², Peabody, D.S.³, Bianconi, M.L.¹, Silva, J.L.¹, Gomes, A.M.O.¹, Souza, T.L.F.⁴ e Oliveira, A.C.¹

¹Programa de Biologia Estrutural/IBqM/UFRJ, Brasil,

²IMPPG/UFRJ, Brasil,

³University of New Mexico/USA,

⁴Faculdade de Farmácia/UFRJ, Brasil.

Aproximadamente 170 milhões de pessoas estão infectadas pelo Vírus da Hepatite C (HCV), o que representa um grave problema de saúde pública mundial. A proteína capsídica do HCV é a responsável pela formação do capsídeo viral e três regiões são especialmente importantes neste processo. Estas regiões compreendem os aminoácidos 22-39 (VKFPGGGQIVGGVYLLPR), 50-67 (RKTTERSQPRGRRQPIPK) e 85-102 (PWPLYGNEGGMGWAGWLLSPRG), e são descritas como capazes de interagir com ácidos nucleicos e modelos de membrana, que mimetizam o material genético viral e o envelope. Para um melhor entendimento de aspectos estruturais e físico-químicos da participação destas regiões na montagem do HCV, realizamos estudos da interação destes peptídeos com modelos de membrana, tais como de dodecil sulfato de sódio (SDS), octil -D-glicopiranosídeo (n-octil) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), e com ácidos nucleicos inespecíficos. Para tal, utilizamos espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular (CD) e calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Análises por CD mostram que os peptídeos utilizados não apresentam estrutura secundária em solução aquosa, e que na presença dos modelos de membrana somente o peptídeo 85-102 adota uma estrutura em α -hélice estável. Além disso, os resíduos de triptofano do peptídeo 85-102 estão envolvidos na interação com membranas, como verificado por espectroscopia de fluorescência. Por ITC, verificamos diferentes parâmetros calorimétricos da interação dos peptídeos com os modelos de membrana. Por outro lado, a termodinâmica de interação do peptídeo 50-67 com os diferentes DNAs é semelhante, o que indica pouca especificidade. Análises de polarização de fluorescência mostraram que a adição do peptídeo 50-67 aos DNAs não impede a formação de NLPs promovida pela proteína capsídica. Nossos dados adicionam informações sobre regiões específicas da proteína capsídica do HCV, as quais podem ser alvos potenciais para o tratamento da hepatite C. **Suporte:** CNPq-CAPES-FAPERJ-PRONEX-INBEB.

BE03

O EFEITO DO TAMANHO DA HEPARINA NA INTERAÇÃO COM A PROTEÍNA PRION.

Murakami, A.Y.¹, Vieira, T.C.R.G.¹, Reynaldo, D.P.¹, Gomes, M.P.B.¹, Almeida, M.S.¹, Cordeiro, Y.² e Silva, J.L.¹

¹Instituto de Bioquímica Médica, IBqM-UFRJ, RJ,

²Faculdade de Farmácia, FF, UFRJ, RJ, Brasil.

As Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs) são um grupo de doenças fatais que afetam animais e humanos, causadas pela isoforma anormal da proteína prion (PrP). Os prions se replicam na célula hospedeira auto-propagando a alteração conformacional das proteínas de superfície celular normais, PrPC, para a isoforma rica em folha- β , a PrPSc. Várias evidências sugerem que glicosaminoglicanos (GAGs), em particular heparan sulfato/heparina, tenham participação no processo de conversão de PrPC em PrPSc. Recentemente nós caracterizamos a mudanças estruturais induzidas pela heparina de baixo peso molecular (LMWHep) na proteína prion recombinante de camundongo (rPrP23-231) e mostramos que a interação com a LMWHep previne a agregação induzida por RNA (J Amer Chem Soc, 2011, 133: 334-344). No entanto, já foi mostrado que GAGs podem estimular a conversão de PrPC in vitro na ausência de célula. Esses efeitos paradoxais podem estar relacionados com a interação diferencial dependente do tamanho da molécula de heparina. No presente trabalho, foram feitas medidas espectroscópicas de espalhamento de luz, fluorescência e ressonância magnética nuclear com o objetivo de investigar essa hipótese. A interação entre rPrP23-231 e heparina não fracionada (UFHep) induziu níveis de agregação/oligomerização, tanto em pH 5,5 quanto em pH 7,4, similares à LMWHep, também transiente. No entanto, UFHep apresentou estequiometria e constantes de dissociação diferentes. Resultados de RMN mostraram diferenças marcantes de deslocamentos químicos da proteína livre e ligada às duas heparinas estudadas em resíduos correspondentes as porções N- e C-terminais, revelando regiões de interação. Dessa forma, podemos inferir que a interação de PrP com a UFHep apresenta diferentes propriedades físicas e químicas, e essas diferenças podem afetar sua conversão.

BE04

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA BEX3 (BRAIN EXPRESSED X-LINKED): UMA PROTEÍNA INTRINSICAMENTE DESESTRUTURADA

Sampaio, L.A.G., Silva, V.S., Cabral, K.M.S. e Almeida, M.S.

IBqM, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

Uma das vias de sinalização da apoptose se dá através do receptor transmembrana p75-NTR. Nesta via, o NGF (nerve growth factor) interage com o receptor p75-NTR e desencadeia uma resposta intracelular que se inicia com a interação da porção intracelular deste receptor com a proteína BEX3. Embora estudos tenham demonstrado a interação entre a proteína BEX3 e o receptor p75-NTR, pouco se sabe sobre os detalhes moleculares desta interação. O objetivo deste trabalho é caracterizar a estrutura 3D da proteína BEX3 e assim caracterizar a nível atômico o modo de interação entre BEX3 e a porção intracelular do receptor p75-NTR. A caracterização da interação que ocorre entre estas proteínas é de extrema importância devido a via de apoptose celular ser considerada um possível alvo de terapia contra o câncer. O cDNA correspondente a BEX3 de camundongo foi expresso em *Escherichia coli*, e a proteína tem sido purificada usando cromatografia em coluna de afinidade ao níquel, seguida por cromatografia em coluna de gel filtração. Análise por 1D 1H-RMN, dicroísmo circular e fluorescência intrínseca do triptofano mostraram que a BEX3 é rica em regiões desestruturadas, além de uma quantidade menor de alfa-hélice e estrutura terciária. Estes resultados foram confirmados através do ensaio feito com proteinase K, visto que esta enzima digeriu parcialmente a BEX3, confirmando a coexistência de regiões desestruturadas e estruturadas. Experimento de ressonância de plasmons de superfície revelaram um Kd para a ligação/dissociação entre a BEX3 e o seu receptor p75-NTR de 0,11 micromolar, o que se adequou em uma curva de um sítio de ligação com $r^2 = 0,9999$. A ligação da BEX3 com a porção intracelular do p75-NTR está sendo caracterizada por RMN através da perturbação do deslocamento químico.

BE08

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO DOMÍNIO DE LIGAÇÃO AO DNA DA PROTEÍNA C-ABL

Moura Fé, L.X.S.G.¹, Oliveira, G.A.P.¹, Pereira, E.G.², Valente, A.P.², Ceneviva, F.A.L.² e Silva, J.L.¹

¹Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregorio Weber, IBqM, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

²Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jones – CNRMN, IBqM, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

A proteína multifuncional c-Abl está diretamente relacionada ao desenvolvimento do fenótipo de uma desordem mieloproliferativa denominada Leucemia Mielóide Crônica (LMC), e atua ativamente como reguladora de importantes eventos celulares. Dentre estes há vias de sobrevivência, proliferação, migração, reparo e morte. Evidências sugerem o envolvimento da proteína c-Abl na regulação negativa do crescimento celular por via dependente de p53 e na fosforilação do domínio C-terminal da enzima RNA polimerase II. Embora a proteína c-Abl possua um domínio de ligação ao DNA (DBD), diversos aspectos referentes à interação proteína-DNA ainda não estão completamente elucidados. O objetivo deste projeto é a caracterização estrutural do DBD da proteína c-Abl. O protocolo de purificação do DBD foi estabelecido em sistema heterólogo de expressão em cepa de *E. coli*. A purificação do DBD foi feita em coluna de afinidade a níquel seguida de gel filtração analítica. A avaliação por dicroísmo circular confirmou a presença de estrutura secundária, indicando padrão de α -hélices e folhas β . Análises feitas por espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXs) permitiram a obtenção de informações sobre tamanho do DBD (raio de giro [Rg] e distância máxima [Dmáx]) e indicam perfil globular e monomérico. Os dados obtidos por SAXs possibilitaram a reconstrução do envelope molecular do DBD. A comparação entre o raio hidrodinâmico, obtido através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), e os valores de Rg obtidos por SAXs fornecem indícios para uma estrutura compacta. O conjunto de dados por Ressonância Magnética Nuclear para o assinalamento da cadeia principal estão em fase de processamento. A obtenção da estrutura do DBD da proteína c-Abl será importante para a elucidação da funcionalidade global da proteína em células normais e leucêmicas.

BC01

OLIGÔMEROS DO PEPTÍDEO BETA-AMILÓIDE INDUZEM ESTRESSE DE RETÍCULO ENODOPLASMÁTICO EM NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS

Lourenço, M.V., Silva, C.A., Bomfim, T.R., Ferreira, S.T. e De Felice, F.G.

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa associada à perda cognitiva e a déficits de memória. Estudos recentes sugerem que oligômeros solúveis do peptídeo amilóide- β (ADDLs) se ligam especificamente às sinapses e provocam diversos efeitos tóxicos, levando à disfunção neuronal. Estas descobertas posicionam os ADDLs como principais neurotoxinas na DA. No entanto, os mecanismos pelos quais esses oligômeros exercem seu papel tóxico ainda não são totalmente compreendidos. O estresse de retículo endoplasmático é um estado celular causado pelo acúmulo excessivo de proteínas mal-enoveladas, redução da atividade do proteossoma e perturbações na homeostase de cálcio e é acompanhado pela ativação de vias específicas de resposta e indução de morte celular após período prolongado. Recentemente, demonstrou-se que marcadores de estresse de retículo estão presentes no cérebro de pacientes acometidos pela DA e que agregados de peptídeo beta-amilóide induzem este evento. Neste trabalho, verificamos que os ADDLs induzem a fosforilação de eIF2 α e IRE-1 e aumento nos níveis de GRP78/Bip, eventos conhecidamente relacionados à ativação de resposta ao estresse. Por outro lado, a degradação protéica associada ao retículo endoplasmático, evidenciada pelos níveis da proteína UBXD2, não é alterada pelos ADDLs. Por último, abordagens farmacológicas demonstraram que o aumento nos níveis de TNF- α e a ativação da quinase de c-Jun (JNK) são necessários para a fosforilação de eIF2 α induzida pelos ADDLs. Estes resultados indicam que os ADDLs induzem estresse de retículo endoplasmático em neurônios hipocampais através da via TNF- α /JNK e sugerem que esse fenômeno seja uma característica proeminente na doença de Alzheimer.

BC03

EFEITO DA ATIVIDADE DA ABCB1 SOBRE CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

Novis, B.F., Daflon-Yunes, N. e Rumjanek, V.M.

Laboratório de Imunologia Tumoral, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Brasil.

Resistência a múltiplas drogas (MDR) é uma das maiores causas de fracasso da quimioterapia. Células tumorais expressam transportadores capazes de extrair diversas drogas, resultando no fenótipo MDR. Dentre esses transportadores a ABCB1 é o mais estudado. Tratamentos de tumores que apresentam o fenótipo MDR e de outras doenças utilizam inibidores da ABCB1. Portanto, o objetivo desse trabalho foi analisar os efeitos dos diferentes estados de atividade da ABCB1 em células de leucemia mielóide crônica. Foram estudadas as linhagens K562, sensível a quimioterápicos, e FEPS, selecionadas a partir da K562 com o quimioterápico daunorrubicina (DNR) e apresenta o fenótipo MDR. As células foram cultivadas na presença de verapamil (VP), inibidor da ABCB1; na presença de DNR, substrato da ABCB1; ou na ausência de ambos por três dias. A viabilidade celular foi verificada por ensaio de MTT e o perfil do ciclo celular foi avaliado por quantificação de DNA utilizando citometria de fluxo. As células viáveis e as células mortas foram contadas usando corante Azul de Tripán. A expressão de ABCB1 foi avaliada utilizando anticorpo específico e a atividade desse transportador foi medida através da incubação com substrato fluorescente, ambos utilizando citometria de fluxo. Os resultados indicam que a FEPS é resistente a DNR devido à expressão de ABCB1 funcional. As FEPS que foram mantidas na presença de VP apresentaram aumento na expressão de ABCB1 e diminuição da viabilidade celular, o que pode ser devido à inibição da ABCB1. As células apresentaram a mesma atividade da ABCB1 independentemente das condições em que foram mantidas. Isso pode ser devido ao aumento da expressão de ABCB1 quando na presença do inibidor. Esses resultados sugerem que a inibição da ABCB1 pode ser compensada pelo aumento da sua expressão.

ÁCIDO PALMÍTICO E OLIGÔMEROS DO PEPTÍDEO β - AMILÓIDE CAUSAM IMPACTO NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA POR UM MECANISMO COMUM EM NEURÔNIOS HIPOCAMPAIS

Melo, H.M., Seixas da Silva, G.S., Figueiredo, C.P., Ferreira, S.T. e De Felice, F.G.

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa e progressiva que culmina em perda de memória e déficits cognitivos. Como a sinalização por insulina no cérebro diminui com o envelhecimento e é extremamente importante para a cognição e função sináptica, a resistência à insulina, uma característica reconhecida recentemente em cérebros de pacientes com a doença de Alzheimer, pode ser central para os déficits de memória relacionados à tal doença. Um mecanismo principal no desenvolvimento de resistência à insulina em doenças como Obesidade e Diabetes é a lipotoxicidade, que se dá pelo aumento de ácidos graxos saturados na circulação, como o ácido palmítico. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar se da mesma forma que é observado em tecidos periféricos, o ácido palmítico é capaz de desencadear resistência à insulina em neurônios. Para tal, neurônios hipocâmpais foram expostos a 0,2 mM de Palmitato de Sódio e os níveis de fosforilação de resíduos de serina inibitórios no IRS-1, foram analisados por Imunocitoquímica e Western Blotting. Este tratamento causou aumento na fosforilação dos resíduos de serina do IRS-1, de forma similar ao que observamos quando tais neurônios são expostos aos oligômeros de A β , que são considerados as principais neurotoxinas da DA. Além disso, animais que receberam injeções de palmitato de sódio intracerebroventricularmente mostram aumento de fosforilação de resíduos de serina no IRS-1 e fosforilação de JNK. Assim, estes resultados mostram que o ácido palmítico e os oligômeros de A β causam impacto na sinalização por insulina por uma via comum e que esta relação entre a resistência à insulina periférica e sua capacidade de ocorrer através da barreira hematoencefálica pode estar relacionada ao estabelecimento das primeiras etapas do desenvolvimento da DA.

Terça-feira (20/09)

LEGENDA:

BMV - Bioquímica de Microorganismos e Vírus | **BM** - Bioenergética e Membranas | **BF** - Bioquímica de Processos Homeostáticos e Fármacos | **BI** - Bioquímica de Insetos | **BE** - Bioquímica Estrutural | **BC** - Biologia Celular | **BP** - Bioquímica de Plantas

ANALISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO FATOR DE RESTRIÇÃO VIRAL RIG-I E DAS LIGASES DE UBIQUITINA RNF125 E TRIM25 EM PESSOAS SAUDÁVEIS E INFECTADAS COM HIV

Britto, A.M.A.¹, Amoedo N.D.², Pezzuto P.¹, Soares M.A.¹, Machado E.S.³ e Giannini A.L.M.¹

¹*Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil,*

²*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil,*

³*Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

RIG-I, RNF125 e TRIM25 são proteínas importantes na ativação da resposta imune inata na detecção de genomas virais, iniciando a cascata de produção de interferon tipo I (IFN-I). RIG-I reconhece o RNA viral em seu domínio helicase. RNF125 e TRIM25 são ligases de ubiquitina que tem como substrato RIG-I, marcando-o para degradação ou ativando-o resultando na produção de IFN, respectivamente. Além disso, foi descrito que RNF125 inibe a infecção por HIV a nível transcricional. O objetivo deste trabalho é determinar os níveis de expressão dos genes para RIG-I, RNF-125 e TRIM 25 em indivíduos saudáveis e em pacientes infectados com HIV e tentar correlacionar os níveis de expressão destes genes com a progressão do paciente para a AIDS. Foram analisados 14 indivíduos saudáveis e 20 infectados, dos quais 10 são progressores e 10 não-progressores. PBMCs foram isoladas de 5mls de sangue desses indivíduos. A partir dessas células foi extraído mRNA total que foi utilizado para síntese de cDNA. O cDNA foi utilizado para quantificação dos genes acima descrito por qPCR utilizando sondas Taqman e GAPDH como controle endógeno. Detectamos que os pacientes não infectados expressam mais RIG-I, RNF125 e TRIM 25 do que os infectados com HIV. Observamos também que ao classificarmos os pacientes infectados como não-progressores (NP) ou progressores, fica claro que o perfil de expressão dos genes RNF125 e TRIM 25 nos NP se assemelha mais ao padrão observado nos indivíduos saudáveis, enquanto que para RIG-I isso não ocorre. Ainda não temos explicação para essa observação, porém não podemos descartar a possibilidade da estabilidade dos produtos gênicos destes genes ser diferente. Esta possibilidade esta sendo agora avaliada.

APOPTOSE INDUZIDA PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA: O PAPEL DA VIA MITOCONDRIAL

Sanches, D.¹, Campos, S.P.C.¹, **Rocha, C.M.¹**, Gaspar, L.P.², Freire, M.S.², Silva, J.L.¹, Gomes, A.M.O.¹ e Oliveira, A.C.¹

¹*Programa de Biologia Estrutural, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), RJ, Brasil,*

²*Departamento de Desenvolvimento Tecnológico, ITI-FIOCRUZ/RJ, Brasil.*

Flavivírus causam doenças como Dengue e Febre Amarela. Esses vírus são transmitidos por artrópodes, principalmente na América do Sul, Central e Sudeste Asiático, onde possuem grande importância na saúde pública. O efeito citopatológico induzido por esses vírus durante a infecção é relacionado a um processo apoptótico in vivo e in vitro. Durante a apoptose, mecanismos celulares como externalização de fosfatidilserina (PS), fragmentação do DNA e liberação de mensageiros das vias apoptóticas ocorrem. Durante a ativação da via mitocondrial, ocorre perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) com ativação de caspases pela liberação de fatores pró-apoptóticos através da formação do complexo de proteínas que constituem o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC). Nesse estudo, investigamos o processo de apoptose induzido pelo Vírus da Febre Amarela (YFV). Para tal, infectamos células Vero com o vírus vacinal YFV 17-dd a uma multiplicidade de infecção (MOI) = 1. Analisamos a viabilidade celular utilizando o ensaio de atividade de lactato desidrogenase (LDH) liberado no sobrenadante. O processo de apoptose foi analisado pela externalização de PS, condensação nuclear e $\Delta\Psi_m$ por microscopia de fluorescência. A fragmentação nuclear apoptótica foi confirmada pela técnica de TUNEL. A importância da via mitocondrial foi observada utilizando-se um inibidor da formação do complexo do VDAC. A dependência de caspases durante o processo de apoptose foi observada através do inibidor de caspases BAF. A apoptose foi observada a partir de 72 h após infecção, com externalização de PS e fragmentação nuclear. Observamos também perda do $\Delta\Psi_m$ a partir de 72 h e a dependência do VDAC na morte celular induzida pelo vírus, demonstrando a ativação da via mitocondrial de apoptose. Nossos resultados sugerem que a via mitocondrial está sendo ativada e contribui ao menos parcialmente para a morte celular dependente de caspases induzida pelo YFV. **Suporte:** CNPq, CAPES, FAPERJ, INBEB, PRONEX.

BMV08

INVESTIGAÇÃO DA VIA DE ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO INDUZIDA PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA

Sanches, D.¹, Campos, S.P.C.¹, Rocha, C.M.¹, Gonçalves, B.S.³, Chiarini, L.B.³, Gaspar, L.P.², Freire, M.S.², Silva, J.L.¹, Gomes, A.M.O.¹ e Oliveira, A.C.¹

¹Programa de Biologia Estrutural, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), RJ, Brasil,

²Departamento de Desenvolvimento Tecnológico, ITI-FIOCRUZ/RJ, Brasil,

³IBCCF-CCS – UFRJ, RJ, Brasil.

Flavivírus são arbovírus e podem causar doenças como Dengue e Febre Amarela. Essas doenças possuem relativa importância na saúde pública de países da América do Sul, América Central, África e Sudeste Asiático. O efeito citopatológico induzido por esses vírus durante a infecção é relacionado a um processo apoptótico in vivo e in vitro. Durante a apoptose, mecanismos celulares como externalização de fosfatidilserina (PS), fragmentação do DNA e liberação de mensageiros das vias apoptóticas, ocorrem. O estresse de retículo endoplasmático (ERS) pode ser disparado pelo acúmulo de proteínas mal-enoveladas (UPR), levando à dissociação do complexo BIP-PERK. Uma vez livre, PERK poderá fosforilar eIF2 α , induzindo grande aumento na expressão de CHOP. CHOP é um fator nuclear que induz a expressão e translocação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 do citosol para a mitocôndria. Investigamos, então, o estresse de retículo endoplasmático induzido pelo Vírus da Febre Amarela (YFV). Para tal, infectamos células Vero com o vírus vacinal YFV 17-dd a uma MOI = 1. Nós analisamos a viabilidade celular pelo ensaio LIVE/DEAD e a localização celular das proteínas virais por microscopia de fluorescência. Nós observamos a expressão de Bip, CHOP, assim como a fosforilação de eIF2 α por Western-blotting. A indução de ERS pelo YFV foi confirmada pelo aumento na expressão de CHOP 48 h após a infecção. Nós não observamos alterações nos níveis de Bip até 72 h após a infecção. A via de PERK foi confirmada pelos níveis intensos de fosforilação de eIF2 α 24 h após infecção. Nossos resultados sugerem que o ERS está sendo ativado e que poderia ser um dos gatilhos para a apoptose induzida pelo YFV através da ativação de PERK e aumento na expressão de CHOP. **Suporte:** CNPq, CAPES, FAPERJ, INBEB, PRONEX.

BM13

FUNÇÃO DA CREATINA QUINASE E HEXOQUINASE MITOCONDRIAIS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NA DIMINUIÇÃO DE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM DIABETES INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA

Thaia da Silva Rodrigues, Clara Rodrigues Ferreira e Antonio Galina Filho

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A glicose é a principal fonte de energia para as células nervosas. Nas últimas décadas tem se observado um aumento na prevalência de diabetes mellitus (DM). DM é uma desordem metabólica provocada pela diminuição da produção e/ou ação da insulina que resulta em um desbalanço da homeostase glicêmica. A hiperglicemia persistente é responsável por um aumento do estresse oxidativo no qual ocorre quando há um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esta associação do estresse oxidativo a diabetes desenvolve complicações neurológicas. O objetivo deste trabalho foi analisar em cérebro de ratos de gênero e idades diferentes o papel da hexoquinase (HK) e creatina quinase (CK) mitocondriais relacionado à geração de EROS provocado pelo estado diabético induzido por estreptozotocina. Mitocôndria de cérebro de ratos (2 meses) foi isolada por gradiente de percoll. Análises detalhadas da cadeia de transporte de elétrons foram feitas através do consumo de oxigênio. A produção de EROS foi medida pelo método fluorescente Amplex Red. Mitocôndrias isoladas de cérebro de fêmeas (1 mês) após indução de diabetes apresentaram um perfil similar entre os controles e diabéticos nos parâmetros respiratórios. Todavia nos machos, houve um aumento em alguns parâmetros de aproximadamente 1,5 vez nos diabéticos. Analisando os perfis respiratórios entre machos e fêmeas, observamos que a respiração na qual a hexoquinase foi ativada no controle, foi aproximadamente 2 vezes maior nas fêmeas. Nos diabéticos, a respiração estimulada por succinato foi aproximadamente 2 vezes maior nas fêmeas enquanto a respiração estimulada pela 2DOG foi aproximadamente 1 vez. O controle respiratório nos machos foi maior que nas fêmeas apresentando uma tendência a ser melhor nos machos diabéticos. A produção de ROS foi maior nos animais diabéticos. Todavia, a atividade específica da HK parece estar diminuída em fêmeas diabéticas.

BM14

O EXERCÍCIO INABITUAL EM DIFERENTES INTENSIDADES PROMOVE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO E PLASMA

Martins, E.L.¹, Mendonça-Marinho, G.¹, Carvalho, R. J.¹, Ramos, D.^{1,3}, Casimiro-Lopes, G.^{2,3}, Galina, A.¹, Sorenson, M.M.³ e Salerno, V.²

¹Laboratório de Bioenergética e Fisiologia Mitocondrial – IBqM/UFRJ,

²Laboratório de Bioquímica do Exercício e Motores Moleculares – EEFD/ UFRJ,

³Laboratório de Química Fisiológica da Contração Muscular – IBqM/ UFRJ Rio de Janeiro.

Introdução: O exercício inabitual pode gerar um quadro de estresse oxidativo, que pode estar relacionado com a intensidade do exercício. **Objetivo:** Avaliar se a intensidade do exercício agudo está relacionada com o quadro de estresse oxidativo em roedores. **Metodologia:** Foram utilizados 30 ratos: Sedentários (SED) – roedores não submetidos ao exercício (n=10); Exercício de baixa intensidade (EBI) – animais submetidos a uma sessão única de exercício contínuo de 30 min. Sem carga adicional (n=10); Exercício de alta intensidade (EAI) – animais submetidos a uma única sessão de exercício intervalado de alta intensidade (EAI) que consistia de 14 séries de 20 segundos de exercício com 10 segundos de descanso entre as séries, com 14% da massa corporal total. O sacrifício dos roedores foi imediatamente após o exercício, as amostras foram armazenadas a -80°C, para análises bioquímicas. Foram medidas a produção de malondialdeído (MDA), a capacidade antioxidante total (CAOT) e os níveis de proteínas carboniladas no plasma. **Resultados:** Ocorreu um aumento de MDA no plasma dos roedores treinados EAI (340%), EBI (230%) em relação ao SED, havendo diferença entre os exercitados. Já os níveis de proteínas carboniladas foram maiores no grupo EAI (30%) em relação ao SED e EBI, enquanto, os níveis de CAOT se mantiveram em todos os grupos. No tecido muscular houve manutenção da CAOT e MDA, no tecido hepático os níveis de CAOT foram maiores no grupo EBI (50%) com manutenção do MDA. No grupo EAI, apenas os níveis do MDA aumentaram (100%). **Conclusão:** O exercício físico agudo gera estresse oxidativo não só no plasma como no fígado, no entanto, este perfil não foi observado no tecido muscular. Nossos resultados sugerem que neste modelo o tecido hepático sofre uma maior ação de radicais livres, que parece refletir sobre o perfil redox do plasma dos animais do grupo EAI.

BM15

ALTERAÇÃO NOS COMPLEXOS MITOCONDRIAIS NO TREINAMENTO DE ALTA INTENSIDADE

Mendonça-Marinho G.¹, Martins, E. L.¹, Ramos D.¹, Casimiro-Lopes, G.^{2,3}, Jardim-Messeder, D.¹, Salerno, V.P.², Sorenson, M.M.³ e Galina, A.¹

¹Laboratório de Bioenergética e Fisiologia Mitocondrial – IBqM/UFRJ,

²Laboratório de Bioquímica do Exercício e Motores Moleculares – EEFD/ UFRJ,

³Laboratório de Química Fisiológica da Contração Muscular – IBqM/ UFRJ Rio de Janeiro.

Introdução: Estudos anteriores sugeriram que os benefícios do treinamento de alta intensidade intervalo (HIIT) em comparação com exercícios de resistência estão relacionados ao aumento na expressão das enzimas oxidativas e biogênese mitocondrial. Além disso, ratos subjetivo HIIT apresentaram diminuição da resistência à insulina e aumento do GLUT4 na membrana celular. Entretanto, as análises da fisiologia mitocondrial nos músculos glicolítico e oxidativo não foram descritas. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a fisiologia mitocondrial nos músculos oxidativos e glicolíticos de animais subjetivo HIIT. **Métodos e Resultados:** Um grupo de cinco ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foi sedentário (S) e os outros treinados por natação até a exaustão durante 3 dias para duas semanas (T). Os ratos foram submetidos ao protocolo de HIIT em piscina durante duas semanas. Os animais foram sacrificados 48 horas depois da última sessão de treinamento. Sóléo e tibial anterior foram isolados e as fibras foram permeabilizadas com saponina para avaliar a atividade oxidativa mitocondrial com diferentes substratos. Não houve alterações da capacidade física, da massa corporal total e na massa de gordura visceral. No entanto, ao contrário das expectativas, não foi observada uma redução de 1,5 vezes o consumo máximo de oxigênio para os músculos tibial anterior (glicolítica) e sóléo (oxidativo), os músculos. **Conclusão:** Contrariamente às expectativas propostas para HIIT observou-se que a capacidade máxima respiração mitocondrial no músculo está diminuída. Este resultado sugere uma adaptação muscular ao exercício físico anaeróbio. **Apoio:** Faperj e CNPq.

BI05

A MODULAÇÃO DO SISTEMA IMUNE DE Aedes aegypti POR HEME APÓS INFECÇÃO BACTERIANA

Octávio Talyuli^{1,2}, Jose Henrique M. Oliveira² e Pedro L. Oliveira²

¹Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Brasil,

²Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.

Após a ingestão de sangue, uma série de alterações fisiológicas ocorrem no mosquito *Aedes aegypti* em especial quando a hemoglobina é digerida e o heme é liberado (Graça-Souza et al., 2006). Frente ao heme e mediado por proteína quinase C, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no epitélio do intestino médio é reduzida contribuindo, desta maneira, para o aumento da flora intestinal do inseto, o que pode levar a alterações em sua capacidade vetorial. Além disso, observou-se também que ROS atua na resposta imunológica do mosquito contra infecções decorrentes da alimentação destes com altas doses de bactérias. Observamos que a infecção dos mosquitos com bactérias, na presença de heme (que é capaz de reduzir ROS intestinal) levou ao aumento da mortalidade. Realizando a infecção do mosquito com *Enterobacter asburiae*, uma bactéria gram-negativa e simbiote da sua flora intestinal, foi constatado que a presença do heme aumenta a mortalidade uma vez que a proliferação da bactéria é facilitada, devido a redução dos níveis de ROS no intestino. Através de experimentos de PCR em tempo real monitoramos a expressão de vias associadas à resposta imune e constatamos a modulação destas frente à presença de heme. Genes de defesa, como defensina, atacina, gambicina e cecropina D tiveram sua expressão reduzida pelo heme. Por outro lado, cecropina G foi significativamente aumentada, enquanto a expressão de TEP, Duox e Heme oxigenase não sofreram modulação diferencial pelo heme.

BI06

A ALIMENTAÇÃO COM SANGUE REDUZ A ATIVIDADE MALATO DESIDROGENASE, ASPARATATO E ALANINA AMINOTRANSFERASE NO MÚSCULO DE VÔO E NO CORPO GORDUROSO DO MOSQUITO Aedes aegypti

Thalles Sequeiros de Figueiredo^{1,2}, Renata de Lima Sales Gonçalves¹ e Marcus Fernandes de Oliveira¹

¹Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Laboratório de Bioquímica Redox,

²Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Brasil.

Os mosquitos vetores são insetos bastante conhecidos do homem, principalmente pelo fato de se alimentarem de sangue e transmitirem doenças de alto impacto para a saúde pública como a dengue e a febre amarela. No *Aedes aegypti* a hematofagia se restringe às fêmeas, pois estas necessitam dos nutrientes presentes no sangue para a ovoposição. Após a alimentação com sangue (ABM) seu metabolismo é remodelado. O músculo de voo (MV) é o tecido mais metabolicamente ativo do reino animal por isso é rico em mitocôndrias, organelas responsáveis pela síntese de ATP e pelo consumo de O₂ celular. A ovoposição é um processo que também demanda muita energia, pois cada fêmea converte os nutrientes do sangue em aproximadamente 75 ovos em apenas 72 horas. A nossa hipótese é que ABM as fêmeas reduzem o metabolismo do músculo de voo para priorizarem a ovoposição. Nosso grupo demonstrou que o consumo de oxigênio e a geração H₂O₂ pelas mitocôndrias do MV são significativamente reduzidos imediatamente ABM. O pico desta redução ocorre concomitantemente ao pico da digestão do sangue e ao final do processo digestivo os parâmetros avaliados voltam aos níveis iniciais (Gonçalves et al., 2009). Estes dados sugeriam que a entrada de substratos na mitocôndria era comprometida após a alimentação. Sendo assim, medimos a atividade da enzima malato desidrogenase do ciclo de Krebs que se mostrou reduzida 24 horas ABM tanto no músculo de voo quanto no corpo gorduroso. Além disso, medimos a atividade das enzimas Alanina e Aspartato aminotransferase. Estas enzimas apresentaram cerca de 50% de redução em suas atividades nos dois tecidos analisados 24 horas ABM. Estes achados corroboram os nossos dados iniciais de que a redução funcional da mitocôndria ABM se deve a uma redução dos substratos para o músculo de voo.

CRISTALIZAÇÃO DE HEME MEDIADA POR INTERFACES HIDROFÍLICO-HIDROFÓBICAS

Stiebler, R.^{1,2}, Sandlin, R.D.², Oliveira, M.P.¹, Bianconi, M.L.¹, Egan, T.J.³, Wright, D.W.² e Oliveira, M.F.¹

¹*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil,*

²*Department of Chemistry, Vanderbilt University, Nashville, TN, USA,*

³*Department of Chemistry, University of Cape Town, South Africa.*

A hemozoina (Hz) é um cristal heme produzido por vários organismos hematófagos como o inseto *Rhodnius prolixus* e o helminto *Schistosoma mansoni* como uma maneira eficiente de detoxificação do heme. Evidências anteriores já demonstraram o papel fundamental de lipídios do intestino médio de *Rhodnius* no processo de cristalização de heme. Além disso, a presença de interfaces hidrofílico-hidrofóbicas e o aumento dos níveis de heme em solução em meio aquoso promovem a formação de b-hematina (Hz sintética). Aqui, nós investigamos alguns aspectos da cristalização heme mediada por diversas interfaces hidrofílico-hidrofóbicas usando lipídios isolados da membrana perimicrovilar (MPMV) do intestino médio do *Rhodnius prolixus* e diferentes detergentes. Nós mostramos que a formação de Hz in vitro mediada por diferentes fosfolipídios ocorre por mecanismos cinéticos distintos, produzindo cristais morfologicamente distintos. A identidade de cristais de Hz foi comprovada por espectroscopia de infravermelho (FTIR). Além disso, a indução da formação de b-hematina por vários detergentes é dose dependente, em uma curva em sino. Medidas de tensão superficial e calorimetria determinaram a concentração micelar crítica (CMC) de detergentes e os experimentos de cristalização demonstraram o envolvimento de mecanismos distintos na formação de Hz. Estes resultados indicam que os lipídios das membranas do intestino médio de *Rhodnius* induzem a formação de Hz por mecanismos distintos, exigindo interfaces hidrofílico-hidrofóbica que parecem ser fornecidas por concentrações lipídicas superiores ao limiar da CMC. **Palavras-chave:** heme, hemozoina, *Rhodnius prolixus*, interface hidrofílico-hidrofóbica.

BE01

ESTABILIDADE ESTRUTURAL DE UMA PLATAFORMA VACINAL PARA O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV-1)

Vicente, A.C.¹, Gomes, D.C.¹, Barroso, S.P.C.¹, Peabody, D.S.², Silva, J.L.¹ e Oliveira, A.C.¹

¹*Programa de Biologia Estrutural, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro,*

²*Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of New México.*

Partículas semelhantes a vírus (VLPs) podem ser consideradas como arranjos densos repetitivos de uma ou mais subunidades de uma proteína e esta característica confere propriedades que são altamente vantajosas para seu uso como plataformas de vacinas. Neste projeto, utilizamos VLPs formadas pela proteína capsídica do bacteriófago MS2. Avaliamos a estabilidade estrutural desta plataforma vacinal para peptídeos altamente imunogênicos relacionados ao ciclo infeccioso do HIV-1, submetendo tais partículas a alta pressão hidrostática (APH) e a outros agentes desnaturantes químicos e físicos. Para essa avaliação, utilizamos medidas de espalhamento de luz, fluorescência intrínseca e extrínseca e dicroísmo circular. Analisamos também a morfologia das VLPs por microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados foram obtidos com a VLP formada por um dímero de cadeia única da proteína capsídica, duas construções do dímero de cadeia única com o epítipo Flag e com as VLPs que contêm peptídeos da alça extracelular do co-receptor celular CCR5 e da alça V3 da proteína gp120 do HIV-1, peptídeos estes descritos por induzir a formação de anticorpos com alto potencial antiviral. Os resultados de fluorescência e de espalhamento de luz indicam haver pequenas mudanças na estrutura das VLPs com a inserção dos epítipos, com exceção dos resultados com APH, onde as construções com os insertos obtiveram um maior desvio do centro de massa espectral. Medidas de dicroísmo circular indicam não ter havido mudança na estrutura secundária entre o dímero de cadeia única e as construções com o epítipo Flag. Os estudos de estabilidade desta nova forma de apresentação de peptídeos imunogênicos buscam contribuir com informações estruturais para o desenvolvimento desta promissora plataforma vacinal. **Suporte:** CAPES-FAPERJ-CNPq-PRONEX-INBEB.

INVESTIGAÇÃO DAS INTERAÇÕES MOLECULARES DURANTE A MONTAGEM IN VITRO DO CAPSÍDEO DO VÍRUS DA HEPATITE C

Braga, V.L.A.¹, **Mendes-Silva, A.**¹, Ferreira, D.F.², Peabody, D.S.³, Silva, J.L.¹, Gomes, A.M.O.¹, Souza, T.L.F.⁴ e Oliveira, A.C.¹¹Programa de Biologia Estrutural/IBqM/UFRJ, Brasil,²IMPPG/UFRJ, Brasil,³University of New Mexico/USA,⁴Faculdade de Farmácia/UFRJ/Brasil.

A Hepatite C é um grave problema de saúde pública, acometendo aproximadamente 3% da população mundial. A proteína capsídica do vírus da Hepatite C (HCV) está envolvida em diversos processos celulares e virais, dentre eles a formação do capsídeo viral. Este trabalho tem como objetivo compreender a montagem do capsídeo viral in vitro utilizando a proteína capsídica do HCV fusionada à Proteína Fluorescente Verde (GFP) (HCVCPGFP). Nossos dados mostram que a fusão da GFP à HCVCP não impede o processo de montagem, uma vez que a partir da adição de ácidos nucleicos inespecíficos verificamos a formação de partículas semelhantes ao nucleocapsídeo (NLPs) por microscopia eletrônica de transmissão. Interessantemente, a formação das NLPs foi observada na presença e na ausência de diferentes sequências de ácidos nucleicos. Análises de espectrofotometria mostraram que a formação das NLPs depende tanto da concentração de proteína quanto de ácido nucleico. Através de ensaios de desvio da mobilidade eletroforética (gel shift), verificamos somente uma banda correspondente a um complexo de alto peso molecular, o que sugere a montagem de NLPs em processo altamente cooperativo em concentrações nanomolares. Visto que a fusão de GFP à HCVCP não inibe a montagem das NLPs, neste momento nossos estudos visam obter informações sobre a localização celular e o processo de montagem em células, utilizando microscopia confocal e espectroscopia de correlação de fluorescência (FCS). Com esse objetivo, foi construído um vetor para expressar a HCVCPGFP em células HepG2 e estes estudos estão em andamento. Nossos resultados iniciais adicionam informações para uma melhor compreensão sobre a montagem do capsídeo do HCV, a qual é um importante alvo para impedir a replicação viral. **Suporte:** CNPq-CAPES-FAPERJ-PRONEX-INBEB.

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA E DE INTERAÇÃO COM DNA DA PROTEÍNA HIGH MOBILITY GROUP B1 HUMANA

Belgrano, F.S.¹, Sousa, F.J.R.¹, Oliveira, F.M.B.², Fantappiè, M.R.² and Ronaldo Mohana-Borges¹¹Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,²Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, RJ, Brasil.

As proteínas High Mobility Group B1 (HMGB1) são encontradas no núcleo de todos os metazoários e possuem um papel intracelular de ligação ao DNA. Esta ligação promove o dobramento do DNA e acredita-se que a HMGB1 tenha o papel de fluidizar a cromatina. A proteína HMGB1 possui 25kDa e 3 domínios: dois de ligação ao DNA, chamados Box A e Box B, e uma cauda ácida C-terminal. Esta proteína também possui alta afinidade por DNA modificado, como minicírculos, junções 4-way, entre outros. Com isso, nosso objetivo consiste na caracterização termodinâmica da proteína completa (HMGB1 Full-length) e da proteína sem a cauda ácida C-terminal (HMGB1 Δ AT), além de avaliar a ligação e dobramento do DNA, para a posterior avaliação do papel da cauda ácida na estabilidade, ligação e dobramento do DNA. Nossos resultados demonstram que a proteína HMGB1 Δ AT possui 25% menos estabilidade quando desnaturada com agentes químicos como ureia e guanidina. Ambas apresentam a mesma estabilidade quando submetidas à desnaturação pelos agentes físicos temperatura ($T_m = 46^\circ\text{C}$) e pressão hidrostática (ausência de desnaturação). Ensaios de polarização com oligonucleotídeos marcados demonstraram que ambas as proteínas apresentam a mesma afinidade de ligação ($K_d = 100\text{nM}$). Apesar disso, em ensaios de dobramento do DNA, foi visto que a proteína HMGB1 Full-length é capaz de realizar um dobramento significativamente maior que a proteína HMGB1 Δ AT. Com isso, verificou-se que a proteína completa é mais estável termodinamicamente, além de ser capaz de realizar maiores dobramentos do DNA do que a versão truncada HMGB1 Δ AT, apesar de ambas possuírem a mesma afinidade de ligação ao DNA. Logo, a cauda ácida não interfere com a ligação ao DNA, mas diminui a capacidade de dobramento do oligonucleotídeo pela proteína.

DIFERENCIAÇÃO NEURAL DE CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA DERIVADAS DE PACIENTE COM ESQUIZOFRENIA

Drummond, H., Paulsen, B.S., Souza, C.S., de Moraes Maciel, R., Setti-Perdigão, P., Castro, N.G. e Rehen, S.K.

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Devido às dificuldades na compreensão da etiologia e sintomatologia da esquizofrenia, o estabelecimento de bons modelos experimentais é essencial para o desenvolvimento de novos tratamentos e o estudo desse transtorno. Dessa forma, o uso de neurônios derivados a partir de células-tronco de pluripotência induzida (iPS) é uma ferramenta interessante, uma vez que essas células adquirem a capacidade de se diferenciar, in vitro, em todos os tipos celulares de um indivíduo adulto. Assim, foram reprogramados fibroblastos de um paciente esquizofrênico (EZQ) e de um indivíduo controle através da transdução com retrovírus contendo os genes Oct 3/4, Sox 2, Klf 4 e c-Myc. A caracterização das colônias obtidas foi feita através de imunocitoquímica para os marcadores de pluripotencialidade Oct 3/4, SSEA 4, TRA 1-60 e TRA 1-81. Além disso, as colônias foram capazes de se diferenciar em corpos embrionários e expressaram marcadores dos 3 folhetos embrionários, detectados por RT-PCR. Para a diferenciação neural, as iPS foram tratadas com 4 μM de ácido retinóico (RA) por 6 dias. As células cresceram sem RA por mais 6 dias, no mesmo meio, e depois foram tratadas com 25 ng/ml de FGF2 por mais 6 dias, originando estruturas semelhantes a tubos neurais. Essas estruturas foram destacadas e plaqueadas em placas cobertas por 5 $\mu\text{g/ml}$ de laminina e 15 $\mu\text{g/ml}$ de poli L-ornitina, sendo mantidas em meio neurobasal suplementado com 1X N2 e 1X B27 por 20 dias. Registros de eletrofisiologia mostraram que os neurônios obtidos apresentaram atividade espontânea consistente a de correntes pós sinápticas e correntes ativadas por voltagem. Dessa forma, concluiu-se que o novo modelo de esquizofrenia, gerado a partir de iPS, foi capaz de gerar neurônios funcionais, possibilitando o estudo de diferentes aspectos. **Apoio financeiro:** INCTC, CNPq e FAPERJ.

EFEITOS IN VITRO DE HIDROCORTISONA E CICLOSPORINA A NO DESENVOLVIMENTO DE TIMÓCITOS MURINOS

Costa, K.M.¹, Paiva, L.S.² e Rumjanek, V.M.¹

¹*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil,*

²*Departamento de Imunobiologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil.*

A glicoproteína P (PgP) é uma proteína transmembrana envolvida no transporte de diversos compostos lipofílicos, incluindo os glicocorticóides. A expressão da PgP em timócitos parece ser regulada durante o desenvolvimento e a subpopulação que não apresenta atividade PgP é justamente a mais sensível à exposição aos glicocorticóides, o que sugere a participação dessa proteína no controle dos níveis intracelulares desse hormônio. Há evidências de que os glicocorticóides desempenham um papel regulatório sobre o timo, mais especificamente, sobre a seleção tímica. Para entendermos o papel desta glicoproteína na susceptibilidade à morte induzida pelos glicocorticóides nos timócitos durante o desenvolvimento intratímico, bloqueamos sua atividade com seu inibidor competitivo, a ciclosporina A (CsA), e os tratamos com hidrocortisona. Os valores são expressos como média \pm erro padrão das células viáveis. O tratamento in vitro com hidrocortisona causou uma diminuição dose-dependente no número de timócitos ($1198 \times 103 \pm 82 \times 103$ no controle para $17 \times 103 \pm 3 \times 103$ em $0,1 \mu\text{M}$ hidrocortisona; $n=3$). A subpopulação duplo-positiva foi a mais sensível ao tratamento enquanto as células maduras se mostraram mais resistentes. O tratamento com CsA mostrou uma tendência de redução dose-dependente no número de timócitos viáveis ($1202 \times 103 \pm 58 \times 103$ no controle, $1086 \times 103 \pm 100 \times 103$ em $0,2 \mu\text{g/ml}$ e $838 \times 103 \pm 88 \times 103$ em $0,4 \mu\text{g/ml}$ CsA; $n=3$). O número de células remanescentes do tratamento com hidrocortisona e CsA ($230 \times 103 \pm 120 \times 103$ em $0,4 \mu\text{g/ml}$ CsA e $0,025 \mu\text{M}$ hidrocortisona) não diferiu do tratamento com hidrocortisona sozinho ($510 \times 103 \pm 302 \times 103$ em $0,025 \mu\text{M}$ hidrocortisona; $n=6$). Por último, verificamos que o percentual de células com atividade PgP após o tratamento com hidrocortisona não diferiu das células do controle ($CD8+ : 28 \pm 7$ no controle e 27 ± 5 em $0,05 \mu\text{M}$ hidrocortisona; $n=5$). Sendo assim, o tratamento com hidrocortisona reduziu o número de células remanescentes independente da atividade PgP, sugerindo que a susceptibilidade dos timócitos murinos a exposição aos glicocorticóides durante o desenvolvimento intratímico não está diretamente relacionada com a atividade PgP.

ESTUDO DO EFEITO DO TRITERPENO ÁCIDO POMÓLICO EM UMA NOVA LINHAGEM DE GLIOBLASTOMA

Guimarães L.P.T.P. e Gattass, C.R.

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

O Glioblastoma Multiforme (GBM) é o tumor cerebral primário mais comum e agressivo. A pouca eficiência da quimioterapia no tratamento desse tumor deve-se em parte à resistência a múltiplas drogas, um processo mediado pela expressão de proteínas transportadoras da família ABC e de proteínas anti-apoptóticas (famílias Bcl-2 e Proteínas Inibidoras da Apoptose/IAPs). A busca de drogas capazes de vencer essa resistência é essencial para o tratamento desse tipo de tumor. Este trabalho visa investigar o efeito do ácido pomólico (AP), um triterpeno que apresentou atividade tumoricida contra linhagens tumorais resistentes, em uma nova linhagem de GBM (GBV). A expressão de mecanismos de resistência pela GBV foi avaliada por FACS. O efeito do AP na viabilidade celular da GBV foi avaliado por MTT. A fragmentação de DNA foi medida pelo pico sub-G1 do ciclo celular em células marcadas com PI, despolarização mitocondrial por marcação com DiOC6, atividade caspase pelo kit da Biovision, atividade das bombas de efluxo com sondas específicas e produção de ROS com H2CFDA por FACS. Os resultados obtidos mostraram que o AP inibe a viabilidade da GBV com um IC50 semelhante obtido para a U87 e A172. O AP induz fragmentação de DNA, alteração do potencial de membrana mitocondrial e ativação de caspases -3 e -9, indicando que seu efeito sobre a GBV é mediado por apoptose. Parte do mecanismo antitumoral do AP pode ser devido à sua capacidade de inibir a atividade da MRP1 e à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) mas é independente da via do PPAR. Trabalhos em andamento visam avaliar o efeito do AP sobre as proteínas antiapoptóticas e identificar o(s) alvo(s) intracelular(es) desse composto.

BC10

DISFUNÇÃO DA SINALIZAÇÃO DE INSULINA NO CÉREBRO DE UM MODELO TRANSGÊNICO PARA A DOENÇA DE ALZHEIMER

Sathler, L.B., Bomfim, T.R., Forny-Germano, L., Brito-Moreira, J., Lourenço M.V., Silva, C.A., Amaral, O.B., Ferreira S.T. e De Felice, E.G.

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa caracterizada pela crônica perda de memória e disfunção sináptica. Recentemente, esta forma de demência tem sido associada a um quadro típico de diabetes, incluindo disfunções na sinalização por insulina. No entanto, o panorama molecular desta associação não está completamente claro. Neste trabalho, observamos que animais transgênicos para a doença de Alzheimer apresentam déficits na sinalização de insulina e alterações comportamentais relacionadas à memória quando comparados aos selvagens. De forma interessante, estímulos insulíntricos causados pela administração de drogas anti-diabetes são capazes de reverter algumas das deficiências observadas. Estes dados corroboram a conexão entre alterações no sistema insulíntrico cerebral e fenótipos característicos da doença de Alzheimer.

ATIVÇÃO DA PROTEÍNA JNK1/2 PELA DROGA ANTICANCER ÁLCOOL PERÍLICO EM LINHAGEM CELULAR DE GLIOMABLASTOMA HUMANO

Silva, C. I.², Garcia, D.G.¹, Souza-Souza, K.F.C.², Soares, M.A.², Amorim, L.M.E.², Castro-Faria, M.V.³, Castro-Faria-Neto, H.C.¹ e Burth, P.²

¹Depto. de Fisiologia e Farmacodinâmica, Fiocruz,

²Depto. de Biologia Celular e Molecular / Inst. de Biologia, UFF,

³Depto. de Medicina Interna / Faculdade de Ciências Médicas, UERJ.

O monoterpeno álcool perílico (POH) usado na fase II de ensaios clínicos é um agente quimioterápico para tumores severos, incluindo gliomas que são um grupo de tumores cerebrais agressivos que infiltram áreas cerebrais adjacentes a sua origem. Em nossos estudos recentes, o POH mostrou um efeito inibitório significativo sobre a atividade da enzima Na/K-ATPase. O transporte iônico realizado pela enzima Na⁺, K⁺ ATPase (NKA) produz um gradiente eletroquímico através da membrana celular, o qual é essencial para manter o potencial de membrana das células em geral e a atividade excitável de células musculares e nervosas, entre outras funções. Além do envolvimento na regulação iônica, muitas evidências indicam a função da Na⁺, K⁺ ATPase como transdutora de sinais. **Objetivo:** Determinar a habilidade do POH em modular a atividade da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) – em particular, JNK1/2 – em linhagens celulares de glioblastoma humano (U87). **Métodos:** Células de glioblastoma humano (U87) foram expostas a diferentes concentrações de POH iguais a 0.1; 0.5 e 1.5 mM por 30 minutos. A ativação da JNK1/2 foi analisada por western blotting. **Resultados:** O tratamento das células durante 30 minutos com POH a 1,5mM induziu significativamente a fosforilação da JNK1/2. **Conclusões:** Este estudo mostrou um resultado inicial sobre a ativação da via de sinalização intracelular em linhagens celulares de glioblastoma humano (U87) pelo POH. Experimentos adicionais estão em andamento visando correlacionar o efeito do POH sobre a sinalização celular mediada pela Na⁺, K⁺ ATPase e a indução de apoptose. **Apoio Financeiro:** FAPERJ; CNPq; FOPESQ-UFF; CAPES. **Palavras-chave:** Na/K-ATPase, álcool perílico, drogas anticancer, células de glioma U87, JNK1/2.

PEQUENOS RNAs DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO

Thiebaut, E.¹, Grativol, C.¹, Domiciano, G.C.¹, Rojas, C.A.¹, Vicentini, R.², Hemerly, A.S.¹ e Ferreira, P.C.G.^{1*}

¹Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Instituto de Bioquímica Médica Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Brigadeiro Trompowski Ed. CCS, 21941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

²Laboratório de Bioinformática e Biologia de Sistemas, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Os microRNAs com 20-25 nucleotídeos de comprimento são componentes chaves na via de regulação da expressão gênica de RNA mensageiro alvo. Muitos estudos têm descrito o envolvimento de microRNAs de plantas em resposta a condições de estresse. Com o avanço das técnicas de sequenciamento, cada vez mais microRNAs vêm sendo encontrados. No presente estudo, nós utilizamos dados de sequenciamento em larga escala para identificar miRNAs de cana-de-açúcar em plantas submetidas a estresse hídrico. Cultivares de cana-de-açúcar com diferentes sensibilidades a seca foram cultivadas em casa de vegetação. Plantas de três meses de idade foram utilizadas no experimento. Foram coletadas plantas controles (tempo 0h) e plantas que receberam o tratamento de seca por 24 h. Oito bibliotecas de pequenos RNAs foram preparadas utilizando pool de cultivares sensíveis e tolerantes a seca submetidas a estresse hídrico e plantas controles, sendo coletada raiz e parte aérea separadamente. As bibliotecas foram construídas pelo sequenciamento Solexa/Illumina. Nós identificamos 35.755.991 reads nas bibliotecas de folha e 24.243.352 reads nas bibliotecas de raiz. Foi utilizado o pipeline do miRProf para identificar os miRNAs conhecidos diferencialmente expressos em cana-de-açúcar sob estresse hídrico. Em todas as bibliotecas o miR159 foi o mais expresso. Utilizando o pipeline do miRCat nós identificamos mais de 200 novos miRNAs candidatos. A análise de pequenos RNAs de cana-de-açúcar submetidas a estresse hídrico pode ajudar a compreender melhor os mecanismos moleculares de resposta da planta a estresse hídrico.

BP02

ANÁLISE DE MIRNAS ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO DE ESTRESSE SALINO EM CANA-DE-AÇÚCAR

Carnavale-Bottino, M., Thiebaut, F., Rojas, C.A., Hemerly, A. e Ferreira, P.C.G.*Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Avenida Brigadeiro Trompowski Ed. CCS, 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*

O crescimento, metabolismo e produtividade vegetal são afetados de maneira negativa quando as plantas são expostas a estresses ambientais. A obtenção de cana-de-açúcar tolerante é muito importante para expandir a plantação desta cultura. O aumento da salinidade do solo causa prejuízo no crescimento e desenvolvimento da planta por toxicidade iônica, deficiência nutricional, déficit hídrico. Recentemente, foi descrito que os microRNAs estão envolvidos na regulação da expressão do seu mRNA alvo pela sua clivagem ou repressão da tradução em plantas. Essa regulação é essencial para o crescimento e desenvolvimento normal da planta e para a adaptação a condições de estresse. O experimento para identificar os miRNAs expressos em cana-de-açúcar em resposta a tratamentos de estresse salino foi realizado utilizando múltiplos pontos de coleta (0h, 6h, 12h e 24h). A variedade de cana-de-açúcar utilizada no experimento foi RB931011 considerada como tolerante a seca. Toletes pré-germinados foram cultivados em casa de vegetação em vasos contendo areia e vermiculita e regados regularmente. O estresse salino foi induzido regando-as com 1L de NaCl (0,34 M). Para cada ponto de coleta, um conjunto de três plantas foi submetido ao estresse e outras três plantas foram utilizadas como controle. Raiz, folha no início do desenvolvimento e folha madura foram coletadas e congeladas separadamente para verificar a expressão diferencial dos microRNAs. O RNA total foi extraído e a análise dos microRNAs maduros foi realizada pelo método de "stem-loop pulsed" RT-PCR. A validação do tratamento foi feita usando o gene *SsNAC23*, envolvido na resposta a estresses abióticos, apresentando uma indução de resposta nessas condições. Três miRNAs envolvidos na regulação por estresse salino descritos em monocotiledônias, foram escolhidos para uma análise preliminar do perfil de expressão nos tecidos coletados. **Financiamento:** INCT Fixação Biológica de Nitrogênio. **Palavras-chave:** miRNAs, cana-de-açúcar, estresse salino, RT-PCR, regulação.

BP03

PAPEL DA AUXINA NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO RADICULAR EM CANA-DE-AÇÚCAR DURANTE A ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS.

Carvalho, T.L.G.¹, Bomfim, A.C.J.S.¹, Pragana, M.L.F., Vicentini, R.³, Baldani, J.I.² e Adriana S. Hemerly¹¹*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil,*²*Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil,*³*Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Brasil.*

A cana-de-açúcar apresenta grande importância econômica e social para o Brasil o que tem alavancado uma busca pela melhoria da produtividade desta cultura. Já foi demonstrado que manipulação do desenvolvimento radicular pode ser uma ferramenta para o aumento de produtividade e biomassa. O desenvolvimento radicular é um processo controlado pelo programa genético e por vários sinais endógenos e ambientais. Estudos demonstraram efeitos positivos da inoculação com bactérias diazotróficas no crescimento radicular. O objetivo do trabalho é realizar uma análise ampla dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento radicular de cana-de-açúcar bem como na promoção de crescimento radicular induzida pela associação com bactérias diazotróficas. A arquitetura radicular de cana-de-açúcar foi analisada em dois genótipos contrastantes: SP70-1143 (de alta Fixação Biológica de Nitrogênio - FBN) e Chuneé (de baixa FBN). O genótipo SP70-1143 apresentou desenvolvimento radicular mais pronunciado quando comparado com Chuneé. A inoculação com bactérias diazotróficas promoveu crescimento do sistema radicular nos dois genótipos, sendo este mais marcante em SP70-1143. Essas diferenças fenotípicas podem justificar, pelo menos em parte, a melhor eficiência na associação do genótipo de alta FBN. Amostras de RNA de raiz dos dois genótipos foram utilizados para construção do RNA-Seq Illumina. A análise do transcriptoma mostra que genes envolvidos na regulação positiva do desenvolvimento radicular são mais expressos em SP70-1143, enquanto repressores são mais expressos em Chuneé. Um fitohormônio chave na regulação do desenvolvimento de raiz é a auxina. Foi observado que tanto níveis de auxina quanto sua distribuição são modificados em plantas durante associação. Vários genes regulados por auxina se mostraram diferencialmente expressos entre os genótipos e em plantas inoculadas. Nossos dados sugerem que a sinalização por auxina é regulada durante a associação com as bactérias diazotróficas e que a promoção de crescimento é, pelo menos em parte, resultado da modulação da via desse fitohormônio. **Apoio financeiro:** FAPERJ, CNPq, INCT, CAPES.

Quarta-feira (21/09)

LEGENDA:

BMV - Bioquímica de Microorganismos e Vírus | **BM** - Bioenergética e Membranas | **BF** - Bioquímica de Processos Homeostáticos e Fármacos | **BI** - Bioquímica de Insetos | **BE** - Bioquímica Estrutural | **BC** - Biologia Celular | **BP** - Bioquímica de Plantas | **EGD** - Educação e Divulgação

MODULAÇÃO DO METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS DO DENGUE EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE DENGUE GRAVE

Siqueira, L.O.F., Assunção-Miranda, I., Cavalheiro, M.G. e Da Poian, A.T.

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

A dengue é uma arbovirose transmitida a humanos cujo agente etiológico é o flavivírus, vírus do dengue (DENV). Há evidências de que o dano hepático é característico das formas graves da doença associado a alterações no metabolismo lipídico dos pacientes infectados. O objetivo deste estudo foi investigar alterações no metabolismo lipídico do tecido hepático in vivo, em modelo animal de dengue grave. Avaliamos por PCR em tempo real a expressão de genes associados a (a) biossíntese lipídica: enzima ácido graxo sintase (FAS) e fatores de transcrição SREBP1 e SRBP2; (b) indução da beta-oxidação: fator PPAR α ; e transporte de lipídeos: proteína MTTP. Camundongos foram infectados intraperitonealmente com 100 PFU do DENV adaptado (n=8) ou com PBS apirrogênico (n=6). Os animais foram sacrificados por deslocamento de cervical nos dias 6 e 8 após infecção. Amostras de sangue foram coletadas através do plexo ocular para obter título viral, contagem de plaquetas e hematócrito. Amostras de fígado foram coletadas para avaliação da replicação viral através da quantificação de partículas infecciosas e análises por RT-PCR. No grupo infectado, foi observada trombocitopenia grave, hepatomegalia com bordos abaulados e aparência esbranquiçada esteatótica em ambos os tempos avaliados. A viremia observada foi de 104 PFU/mL no 6º dia e 105 PFU/mL no 8º dia. No 6º dia, a replicação no fígado chegou a 107 PFU/mL e a expressão de FAS aumentou ~2,5 vezes sugerindo estímulo à biossíntese lipídica. A expressão de MTTP e PPAR α foi reduzida em 25% e 50% respectivamente, sugerindo acúmulo hepático de lipídios até oitavo dia após infecção. As análises da expressão de SREBP1 e SREBP2 não demonstraram nenhuma alteração em relação ao controle. Entretanto, não podemos excluir que em momentos mais precoces estes genes sejam modulados. Os resultados mostraram forte ligação entre a infecção viral e dano hepático associado a distúrbios no metabolismo lipídico.

BMV10

ANÁLISE DO PADRÃO DE FOSFORILAÇÃO DAS CÉLULAS HEPG2 APÓS A INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE TIPO 2

Caruso, M.B.¹, Higa, L.M.², Oliveira-Carvalho, A.L.¹, Da Poian, A.T.² and Zingali, R.B.¹

¹Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica,

²Laboratório de Bioquímica do Vírus, IBqM, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

O vírus da dengue é um Flavivirus transmitido aos humanos pela picada do mosquito *Aedes aegypti*. Diversos trabalhos sugerem que esse vírus utiliza o fígado como sítio de replicação. De acordo com a literatura a infecção pelo vírus da dengue é capaz de regular eventos de sinalização celular, por meio da fosforilação, portanto é necessário elucidar quais proteínas participam desses processos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é identificar fosfoproteínas que possam estar associadas à infecção por dengue. Para tal, o extrato celular de células HepG2 (linhagem de hepatoma celular) infectadas ou não pelo vírus da dengue tipo 2 foram analisadas após a infecção de acordo com um curso temporal pré-determinado (1/2, 2, 8 e 24 hs). Ambos extratos foram tratados com inibidores de proteases e fosfatases, lisados e precipitados (TCA/cetona). Em seguida as amostras foram analisadas por eletroforese bidimensional seguida por coloração com Pro-Q Diamond (reagente usado para selecionar fosfoproteínas). Nossos resultados revelaram diferenças no padrão de fosforilação na mesma condição ao longo curso temporal utilizado. Associado esse fato, notamos um aumento no grau de fosforilação nas proteínas fosforiladas pertencentes ao extrato celular infectado. Essas fosfoproteínas foram extraídas dos géis, digeridas e analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF-TOF permitindo a identificação das seguintes moléculas: Hsp70, protein disulfide isomerase-related protein 5, ATP synthase beta subunit e hnRNP C1/C2. Essas proteínas foram descritas em outros trabalhos interagindo com o vírus da dengue indicando uma possível relevância durante a infecção.

ESTUDOS SOBRE O METABOLISMO REDOX NAS FORMAS INTRAERITROCITICAS DO PARASITO DA MALÁRIA PLASMODIUM FALCIPARUM

Camila N. Batista¹, Andre L. L. Areas¹, Juliana B.R. Corrêa Soares², Rubem F.S. Menna-Barreto³, Marcus F. Oliveira² e Mariano G. Zalis¹

¹Laboratório de Infectologia e Parasitologia Molecular – HUCFF- UFRJ- Brasil,

²Laboratório de Bioquímica de Resposta ao Estresse – IBqM – UFRJ – Brasil,

³Laboratório de Biologia Celular – IOC – Fiocruz – Rio de Janeiro – Brasil.

A malária causada por *Plasmodium falciparum* é responsável pela maioria dos casos graves da doença. Uma das principais medidas de controle se baseia no tratamento da infecção com drogas quinolônicas como a cloroquina, cujo mecanismo de ação se baseia na ligação com heme e inibição da formação de hemozoína (Hz), cristal produzido durante a detoxificação de heme. O heme livre exerce efeitos deletérios como a desestabilização de membranas e desequilíbrio redox. A necessidade da neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) e da detoxificação de heme fazem com que o parasita seja altamente dependente das defesas antioxidantes. Nosso trabalho pretende verificar se a cloroquina exerce seu efeito através do desequilíbrio redox nas formas intraeritrocíticas do *P. falciparum* e analisar a expressão de genes envolvidos em resposta antioxidante. Inicialmente, validamos as condições necessárias para a detecção de ROS por citometria de fluxo utilizando parasitas enriquecidos por Percoll e marcados com a sonda fluorescente sensível a ROS dihidroetidina (DHE). Definimos os valores das concentrações sub-letais de cloroquina em ensaios de sobrevivência *in vitro* e iniciamos a pesquisa de anti-oxidantes eficientes na diminuição do sinal de DHE em parasitas tratados ou não com doses sub-letais de cloroquina, utilizando microscopia de fluorescência. Nossos dados indicam que a linhagem Haiti mostrou maior nível de ROS do que a linhagem W2, na ausência do tratamento com cloroquina. Observamos também que, independente da linhagem, o tratamento com cloroquina causou um aumento significativo do sinal de fluorescência de DHE. A utilização de scavengers como urato e alfa-tocoferol não reverteram o sinal de fluorescência da DHE. Podemos concluir que o fenótipo de resistência a cloroquina parece envolver alterações do metabolismo redox e que a cloroquina é capaz de promover um desequilíbrio redox em *P. falciparum*, reforçando o paradigma atual sobre o mecanismo de ação deste composto. **Apoio:** FAPERJ, MFO-JCNE 2010, Capes e CNPq.

BM10

CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DESACOPLADORA EM MÚSCULO BRANCO DE PEIXES DOURADOS

dos Santos, R.S., Amoêdo, N.D., de Vitto, H. e da Silva, W.S.

Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

As proteínas desacopladoras (UCP) são proteínas integrais de membrana localizadas na membrana mitocondrial interna, as quais são capazes de mediar um vazamento de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial. Embora ortólogos de UCP tenham sido identificados em ciprinídeos, suas funções não são claramente compreendidas. O objetivo do nosso estudo foi caracterizar uma UCP de músculo branco de peixes dourados. Para isso, medimos as taxas de consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas com succinato como substrato respiratório. Após a indução do estado 4o com oligomicina e carboxiatractilosídeo (CAT), a adição de palmitato (PA) foi capaz de aumentar o consumo de oxigênio de maneira dose-dependente, o qual não foi diminuído por GDP, mas foi completamente abolido pela adição de BSA. A contribuição do translocador de nucleotídeos de adenina (ANT) para o vazamento de prótons foi medida no estado 4o sem CAT e observamos que, dependendo da concentração de PA, mais de 50% do desacoplamento induzido por PA estava relacionado ao ANT. As taxas respiratórias foram medidas com e sem PA e observamos que a adição de PA após o estado 4 aumentou o consumo de oxigênio e diminuiu a razão de controle respiratório (RCR) e a razão ADP/O. Além disso, vimos que um sistema gerador de superóxido (xantina e xantina oxidase), estimulou o consumo de oxigênio no estado 4o. Nossos resultados sugerem que a mitocôndria de músculo esquelético de peixe dourado apresenta uma UCP, a qual é estimulada por ácidos graxos e superóxido, embora não seja inibida por GDP. **Financiado por:** FAPERJ, PRONEX e CNPq.

BM11

EFEITOS DA TERAPIA POR CORRENTE ELÉTRICA CONTÍNUA EM CÉLULAS TUMORAIS A549

Teixeira, C.A.A.¹, **Vasconcelos, G.**², Jardim-Messeder, D.², Galina, A.² e Holandino, C.¹

¹Laboratório Multidisciplinar em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia - FF,

²Laboratório de bioenergética e Fisiologia Mitocondrial, Instituto de Bioquímica Médica - IBqM, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.

A terapia eletroquímica (EChT) é uma alternativa para o tratamento antitumoral, que se baseia na utilização de uma corrente elétrica direta (DC) sobre o local do tratamento. Esta terapia já é utilizada no tratamento de tumores sólidos em países como Brasil, China e Cuba. Algumas vantagens da EChT é o baixo custo e a alta eficácia terapêutica e segurança. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares da EChT ainda não estão claros, o que torna difícil estabelecer-la como uma terapia antitumoral. Nosso grupo de pesquisa tem ao longo dos últimos anos avaliado os efeitos *in vitro* da EChT, em uma linhagem de células leucêmicas, caracterizando o fluxo anódico (AF) como um indutor de apoptose. O presente trabalho tem como objetivo avaliar, por oxigrafia de alta resolução, os efeitos do tratamento com AF sobre a respiração celular e suas correlações com os efeitos sobre a viabilidade celular e morfologia da linhagem de células humanas de tumor de pulmão A549. Células A549 foram tratadas com 2 mA de DC de 2 a 10 minutos. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão pelo corante Trypan Blue. A morfologia celular e a respiração foram avaliadas após 10 minutos do AF pelo método de May-Grumwald-Giensa e por oxigrafia de alta resolução respectivamente. Houve perda da viabilidade celular em aproximadamente 50%, sendo acompanhada por perda da capacidade respiratória e da síntese de ATP mitocondrial. Além disso, verificamos que o tratamento com AF aumenta a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) por eletrólise o que também pode colaborar para o efeito negativo deste tratamento sobre a viabilidade celular. **Supporte Financeiro:** FAPERJ, FUJB, CNPq.

BM12

EFEITO DO ESTROGÊNIO NA MODULAÇÃO DAS QUINASES MITOCONDRIAIS COMO POSSÍVEL AGENTE ANTIOXIDANTE DA GERAÇÃO DE ROS

Eduardo de Souza Ferreira, Clara Rodrigues Ferreira e Antonio Galina

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O cérebro é um tecido que demanda muita energia, sendo a fosforilação oxidativa essencial para manter a alta demanda de ATP. Em crises bioenergéticas, a respiração mitocondrial diminuída produz um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Dentre muitos mecanismos sugeridos na literatura para a diminuição de EROS mitocondrial, o estrogênio surge como possível regulador para o aumento da produção de EROS induzindo a associação da Hexoquinase-II (HK-II) ao canal aniónico voltagem dependente em células neuronais. O objetivo foi analisar em ratos de diferentes idades e gêneros, assim como em ratas ovariectomizadas, o papel das quinases mitocondriais como agente preventivo da geração de EROS. Mitocôndria de cérebro de rato foi isolada por gradiente de percoll. Análises detalhadas da cadeia de transporte de elétrons foram feitas através do consumo de oxigênio. A produção de EROS foi medida pelo método fluorescente Amplex Red. Os resultados mostraram que machos (5 meses) quando comparado com as fêmeas da mesma idade em resposta a adição (2mM piruvato/malato, 5mM glutamato e 10mM succinato) apresentaram perfil similar nos parâmetros respiratórios. Todavia, quando a respiração foi estimulada pela ativação da HK com 20mM 2-DOG, ambos os sexos não houve diferença. Os parâmetros respiratórios foram aproximadamente 2 vezes menores em machos e quando comparados ambos os gêneros (ratas mais velhas foram menor que ratas mais novas). Nenhuma diferença foi observada no controle respiratório e respiração ativada pela HK e CK entre sham, ovariectomizadas e ratas reposta por estrogênio. Outra diferença observada foi a similaridade da respiração induzida pelo estado 3 e depois da adição de FCCP (respiração máxima) em fêmeas jovens. Onde, em fêmeas mais velhas, a respiração induzida pelo estado 3 foi aproximadamente 1/3 da respiração máxima induzida pelo FCCP. A produção de EROS apresentou uma tendência a ser menor em ratas ovariectomizadas comparados a sham.

GLICONEOGÊNESE NO CARRAPATO RHIPICEPHALUS MICROPLUS

Moreira, J.R.^{1,3}, Vieira, L.R.^{1,2,3}, Coutinho, M.A.A.^{1,3} e Braz, G.R.C.^{1,3}

¹Dep. Bioq., IQ, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil,

²IBqM, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil,

³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular, Brasil.

O carrapato *Rhipicephalus microplus* causa grandes prejuízos econômicos na pecuária mundial. Atualmente seu controle é feito por acaricidas, o que resulta no surgimento de carrapatos resistentes. Sendo assim torna-se necessário o desenvolvimento de alternativas no controle deste artrópode. Para tal, o entendimento de seus mecanismos fisiológicos é essencial. Os carrapatos são hematófagos obrigatórios e apesar da pequena quantidade de carboidratos presente no sangue ingerido, acumulam glicogênio em seus tecidos. Ao que pese a relevância da gliconeogênese para estes ectoparasitas, quase não existem informações sobre este processo. Por conseguinte, desenhamos uma abordagem baseada em Bioinformática e Biologia Molecular para estudar este processo metabólico no carrapato bovino. Desta forma, utilizamos as sequências expressas (ESTs) do *R. microplus* disponíveis no GenBank bem como as do carrapato *Ixodes scapularis*, organismo filogeneticamente mais próximo com o genoma sequenciado. Identificamos ESTs de quatro das enzimas envolvidas com a gliconeogênese e glicólise: Fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK), frutose 1,6-bisfosfatase (FBPase), fosfofrutocinase (PFK1) e piruvato cinase (PK). Além destas, foram encontradas duas transaminases (fornecedoras do esqueleto de carbono usados na gliconeogênese). Duas enzimas de interesse, piruvato carboxilase e frutose 2,6 bisfosfato cinase/fosfatase (PFK2), foram encontradas apenas nas sequências de *I. scapularis*. Com base nisto fizemos um RT-PCR utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA do corpo de fêmeas partenogêna e teleôgena de *R. microplus*. Apenas a piruvato carboxilase não foi amplificada. Após estes resultados realizamos qPCR para quantificarmos a expressão dessas enzimas nas duas fases de vida. PFK2, PEPCK e FBPase apresentaram níveis de expressão diferentes entre as fases de vida, já para PK e PFK1 não houve diferença na expressão. Os resultados obtidos evidenciam que há expressão diferencial destas enzimas nas fases do ciclo de vida do carrapato e este processo metabólico parece ser importante tanto para a fêmea durante a fase de ovogênese quanto na fase de ingurgitamento.

O PAPEL DA PROTEÍNA LIGADORA DE HEME (RHBP) NO DESENVOLVIMENTO DOS OVÓCITOS E TRANSPORTE DE HEME NO INSETO HEMATÓFAGO RHODNIUS PROLIXUS

Walter-Nuno, A. B.¹, Rojas, V.B.¹, Oliveira, P.L.¹ e Paiva-Silva, G.O.¹

¹Laboratório de Artrópodes Hematófagos, IBqM, UFRJ.

O *Rhodnius prolixus* é um inseto hematófago e como tal ingere grandes quantidades de sangue durante sua alimentação. A digestão da hemoglobina, no lúmen intestinal, gera heme livre que é capaz de induzir dano oxidativo a moléculas essenciais ao animal. Este inseto possui em sua hemolinfa a proteína ligadora de Heme (RHBP), na forma de apoproteína, capaz de ligar heme livre e assim suprimir os seus efeitos citotóxicos. Neste trabalho observamos as implicações do silenciamento da RHBP sobre o metabolismo do inseto e estudamos a interação da RHBP com o intestino e coração, órgãos que constituem os dois principais tecidos envolvidos na degradação do heme. As fêmeas cuja expressão de RHBP foi silenciada, pela técnica de RNAi, não tiveram a sua postura de ovos afetada. Entretanto, produziram ovos brancos, indicativos da ausência de RHBP. Estes ovos foram inviáveis indicando que a RHBP é essencial para o desenvolvimento do embrião. Ensaios de microscopia de fluorescência utilizando RHBP marcada com o fluoróforo Rhodamina (RHBP-Rhd) indicaram que aRHBP é capaz de ligar ao coração e ao intestino posterior do inseto, com cinética e padrão de distribuição distintos, indicando que estes dois tecidos podem executar papéis biológicos distintos em relação ao metabolismo do heme. Ensaios de incubação *in vitro* de corações na presença de RHBP-Rhd utilizando um excesso de RHBP não-marcada revelaram que a ligação da RHBP neste tecido é específica. Além disso, a presença de clorpromazina, um inibidor de endocitose mediada por clatrina reduziu a captação da RHBP, corroborando a hipótese de que a captação da RHBP pelas células do coração deste inseto ocorra por um mecanismo de endocitose mediada por receptor específico.

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA HEME OXIGENASE EM RHODNIUS PROLIXUS, VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS

Douglas Bandeira Rocha, Ana Beatriz Walter Nuno, Pedro L. Oliveira e Gabriela O. Paiva-Silva

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O *Rhodnius prolixus* é um inseto hematófago obrigatório, principal vetor da doença de Chagas no norte da América do sul e na América central. Ao se alimentar, o barbeiro ingere de 5 a 10 vezes do seu próprio peso em sangue. Esses insetos passam por um grande desafio metabólico, pois a digestão da hemoglobina no trato intestinal desses insetos resulta na liberação do heme. Quando livre, é extremamente tóxico, levando à formação de espécies reativas de oxigênio. Isso resulta em vários danos celulares, como a peroxidação de lipídeos e promoção da lise celular. Um dos mecanismos de proteção contra os potenciais danos causados pelo heme livre é a enzima Heme Oxigenase (HO), responsável por catalisar a degradação oxidativa do heme. O objetivo do trabalho é avaliar a existência de uma HO e avaliar o perfil de expressão da enzima heme oxigenase nos diversos tecidos, em diversas situações metabólicas como na digestão e sob o efeito de agentes pró e antioxidantes. A partir de um banco de dados de sequenciamento de bibliotecas de cDNA de intestinos de fêmeas adultas feito em nosso laboratório, foi possível identificar um transcrito cuja sequência codifica uma HO putativa (RpHO). Para tal, foi utilizado uma análise de similaridade das sequências do banco de dados com o gene da HO de *Aedes aegypti* (XP_001658955.1) utilizando a ferramenta tBLASTx. A proteína traduzida a partir do gene identificado apresenta alta similaridade com HO de outros organismos. Foi possível detectar a expressão da RpHO em vários tecidos do inseto. Além disso, demonstramos por ensaio de PCR em tempo real que sua expressão parece ser modulada no intestino médio pela alimentação. Como meta, pretendemos estudar o papel da HO como um mecanismo antioxidante, silenciando sua expressão pela técnica de RNA de interferência e medindo os danos oxidativos produzidos nos animais silenciados.

BE09

SIMULAÇÃO DE DINÂMICA MOLECULAR DA PROTEÍNA REGULADORA DE APOPTOSE BID APÓS ATIVAÇÃO POR CLIVAGEM DO N-TERMINAL E MIRISTOILAÇÃO

Cristóvão F. Iglesias Junior, Paulo R. Batista, Pedro A. L. Loureiro, Samuel S. R. Pita e Pedro G. Pascutti

Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular - LMDM, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - IBCCF/UFRRJ.

As proteínas da família BCL-2 (como BAX, Mcl-1 e BID) são importantes reguladoras da apoptose. A proteína BID (domínio agonista de interação BH3) é pró-apoptótica, e ganha capacidade funcional após sofrer uma clivagem e miristoilação no N-terminal em consequência a uma sinalização de morte celular. Após esta clivagem e miristoilação BID sofre uma mudança conformacional e passa a ser conhecida como tBID (domínio agonista de interação BH3 truncado) podendo agora se inserir na membrana mitocondrial, levar a célula a apoptose, por exemplo, ativando BAX. Embora estas informações estejam disponíveis, ainda não se tem conhecimento sobre os detalhes moleculares das mudanças conformacionais de tBID que permitem a inserção na membrana mitocondrial externa e a interação através de seu domínio BH3 com outras proteínas da família Bcl-2. Nosso objetivo é estudar estas mudanças conformacionais de tBID através de simulações de Dinâmica Molecular a fim de conhecer os detalhes moleculares das mudanças conformacionais de tBID que nos permitam obter um modelo dinamicamente estável desta proteína que possa ser usado como alvo para fármacos. Para isto realizamos uma simulação de 100ns de tBID miristoilada e observamos, que a superfície eletrostática de tBID miristoilada se tornou mais carregada positivamente e expôs ao solvente as alfa-hélices hidrofóbicas 6 e 7. Além disso, expôs ao solvente o domínio BH3 e adotou uma conformação similar à da BAX. Deste modo, obtemos um modelo de tBID miristoilada que apresenta as características necessárias para atividade e para poder interagir com outros membros da família Bcl-2 através de seu domínio-BH3. **Palavras chave:** apoptose, tBID, Dinâmica molecular.

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO DOMÍNIO IK (DUF 1935) DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À CALPAÍNA DE CINETOPLASTÍDEOS**Menezes, R.S.** e Pires, J.R.*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil*

A doença de Chagas, doença do sono, e leishmanioses estão entre as doenças tropicais negligenciadas, que costumam afetar populações mais pobres e têm pouca prioridade na saúde pública. Recentemente foram sequenciados os genomas dos cinetoplastídeos *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*, agentes etiológicos destas doenças, ampliando-se assim as perspectivas de pesquisa por novos fármacos. As calpaínas constituem uma grande família de cisteína-proteases dependente de cálcio. São proteínas heterodiméricas, constituídas de uma subunidade de cerca de 80 kDa e outra de cerca de 28 kDa. A maior é dividida em quatro domínios, sendo o domínio N-terminal I (Ik) específico de cinetoplastídeos e de função ainda desconhecida. Tal domínio não apresenta similaridade de seqüência primária com outras proteínas conhecidas. Neste trabalho, uma proteína de *T. cruzi* (Código de Acesso Unitprot: Q4CYU3) que contém um único domínio Ik foi clonada, expressa, purificada e teve sua estrutura em solução resolvida por técnicas de RMN. É estruturada como um sanduíche-beta, contendo duas folhas β pregueadas, uma com 4 e a outra com 5 fitas-beta anti-paralelas. O enovelamento do domínio Ik é similar a de enzimas hidrolases, mas esta função é improvável já que os resíduos catalíticos não estão conservados. O estudo da dinâmica por RMN mostra que a estrutura é bem ordenada, exceto nas porções N- e C-terminal, onde apresenta flexibilidade, na escala de pico- a nanosegundos. A fita $\beta 5$ também é revelada como uma região com maior mobilidade interna, na faixa de micro- a milissegundos.

ESTUDOS DA AGREGAÇÃO DO MONÔMERO DA VARIANTE NÃO AMILOIDOGÊNICA DA TRANSTIRRETINA**Rodrigues, M.P.**, Fontes, L.A.S., Palhano, F., Braga, C.A. e Foguel, D.*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

A Transtirretina (TTR) é uma proteína homotetramérica de 55 kDa, sintetizada principalmente pelo fígado, e em menor proporção pelo plexo coróide. Presente no plasma e no fluido cérebro-espinal tem como função transportar a proteína ligadora de holo-retinol, além de realizar o transporte secundário de tiroxina. Existem mais de cem mutações pontuais descritas na literatura envolvidas com doenças amiloidóticas relacionados à transtirretina. A Polineuropatia Amiloidótica Familiar trata-se de uma doença autossômica dominante caracterizada pelo depósito de agregado amilóide no sistema nervoso periférico. Esses agregados são formados após a dissociação do tetrâmero e desenovelamento parcial do monômero. A mutação T119M foi identificada em uma família com alta incidência da variante amiloidogênica V30M, suavizando os sintomas desta mutação agressiva. Desta forma, a incorporação de uma subunidade monomérica de T119M em um tetrâmero com a mutação V30M (trans-supressão) pode ser uma estratégia para estabilizar o heterotetrâmero e inibir a sua agregação. Nosso grupo vem desenvolvendo um modelo de trans-supressão voltado para terapia dessas amiloidoses. Esse projeto conseguiu obter monômeros da variante TTR-T119M (M-T119M) por meio da elaboração de um protocolo de dissociação através da combinação de baixo pH, baixa temperatura e alta pressão hidrostática. No decorrer desta pesquisa, verificou-se que o M-T119M é suscetível a agregação. Visto que estes monômeros provêm de uma estrutura tetramérica estável, a agregação destes mostrou-se como um importante objeto de estudo visando a aplicação dos mesmos como terapia. Neste trabalho objetivamos estudar a via de agregação do M-T119M, assim como caracterizar os agregados formados. Em condição de desnaturação parcial, pH 4.4, o M-T119M forma agregados, comportamento observado por outras variantes monoméricas da transtirretina. De acordo com os dados de cinética de agregação acompanhadas por medidas de espalhamento de luz, após 16 horas, o M-T119M agrega 13 vezes mais quando submetido a pH 4.4, em relação ao mesmo na sua forma solúvel (pH 3.0). Após vinte e dois dias, sem agitação a 37°C, os agregados do M-T119M se mostram amorfos iniciando a formação de protofibrilas. A fim de caracterizar sua estabilidade, estes agregados foram submetidos à alta pressão hidrostática (42.000 psi) frente a qual não foram resistentes. Os dados obtidos até aqui demonstram que a variante T119M tem sua estabilidade estrutural afetada quando na forma monomérica, sendo importante a caracterização da agregação do M-T119M a fim de aplicá-lo como uma terapia.

BC12

DETECÇÃO DE UM POLISSACARÍDEO INTRACELULAR SIMILAR À GLUCURONOXILOMANANA EM TRICHOSPORON MUCOIDES**Zimbres, A.C.,** Albuquerque, P.C., Nimrichter, L. e Rodrigues, M.L.*Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ.*

Nas últimas décadas houve um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas no mundo. Este aumento deve-se, de maneira geral, ao crescente número de pacientes imunocomprometidos e aos avanços da medicina que geram situações de imunodepressão. Neste contexto, membros do gênero *Trichosporon*, como *T. mucoides* e *T. asahii*, são considerados importantes agentes causadores de infecções disseminadas em imunocomprometidos. Apesar deste fato, seus atributos de virulência e mecanismos de patogenicidade são ainda pouco conhecidos. Diversos estudos indicam a presença de glucuronoxilomanana (GXM), principal fator de virulência do patógeno encapsulado *Cryptococcus neoformans*, em espécies do gênero *Trichosporon*. Este polissacarídeo já foi caracterizado em *T. asahii*, mas sua presença em *T. mucoides* é controversa. Neste estudo, investigamos se *T. mucoides* é capaz de produzir GXM, usando técnicas de microscopia de luz e eletrônica de varredura, ensaios de fagocitose e através de testes bioquímicos e sorológicos. Nossos resultados indicaram que *T. mucoides* é capaz de produzir GXM, mas não apresenta mecanismos de exportação do polissacarídeo para o espaço extracelular nem para ancoramento do polissacarídeo na superfície celular. Dessa forma, o *T. mucoides* parece representar o primeiro modelo de espécie produtora de GXM na qual o polissacarídeo não é secretado. Embora essa observação leve a crer que em *T. mucoides* a GXM não interfere com a patogênese fúngica, entendemos que nosso trabalho sugere que essa espécie pode representar um excelente modelo de estudos de mecanismos secretórios utilizados por fungos, dada a sua clara deficiência na exportação de polissacarídeos. Para confirmação da hipótese sugerida acima, consideramos que serão necessários ensaios futuros para observação de polissacarídeos intracelulares por microscopia eletrônica de transmissão, além de ensaios sorológicos incluindo painéis de vários anticorpos monoclonais anti-GXM e diferentes cepas de *T. mucoides*.

BC13

EFEITO ANTINEOPLÁSICO E IMUNOMODULATÓRIO DA PTEROCARPANOQUINONA SINTÉTICA LQB-118 IN VIVO**Dumas, M.L.¹,** Salustiano E.J.¹, Netto, C.D.², da Silva, A.J.M.³, Costa, P.R.R.³ e Rumjanek, V.M.¹¹*Laboratório de Imunologia Tumoral, Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ,*²*Laboratório Integrado Multiusuário II, Instituto Macaé de Metrologia e Tecnologia, UFRJ, Campus Macaé,*³*Laboratório de Química Bioorgânica, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, UFRJ.*

O câncer é uma malignidade de difícil tratamento e o fenótipo de resistência a múltiplas drogas contribui para o fracasso da quimioterapia. Atualmente, há grande interesse pelo desenvolvimento de novos e seguros agentes quimioterápicos. Com esse propósito, inspirados em dois compostos naturais (pterocarpanos e naftoquinonas), nosso grupo sintetizou uma nova molécula híbrida chamada LQB-118. Uma vez que sua eficácia *in vitro* já foi comprovada, esse trabalho visa avaliar a toxicidade da LQB-118 em modelo murino, enfatizando o efeito sobre as células do sistema imune. O efeito da LQB-118 sobre o crescimento do melanoma murino B16F10 *in vivo* também foi observado. Camundongos suíços receberam uma dose aguda da LQB-118. Após diferentes períodos de tempo a alteração de peso e o comportamento desses animais foram observados. Ao mesmo tempo, a hematopoiese e linfopoiese também foram avaliados através da contagem do número absoluto de células do timo, baço e medula óssea. Em adição, as células desses órgãos linfóides foram analisadas por citometria de fluxo para detecção de alterações das subpopulações celulares. Além disso, o efeito antineoplásico da LQB-118 foi avaliado. 105 células B16F10 foram injetadas subcutaneamente em camundongos C57BL/6 e os animais foram tratados durante 14 dias com injeções intraperitoniais diárias da LQB-118. Após o tratamento a massa tumoral foi excisada e teve peso e tamanho avaliados. Foi observado que a LQB-118 não demonstrou toxicidade para camundongos jovens e adultos, já que não pareceu alterar o ganho de peso dos animais, o peso e o número absoluto de células dos órgãos do sistema imune. Entretanto, LQB-118 parece reter as células T CD4+ no timo, aumentado a sua porcentagem nesse órgão e a diminuindo no baço. Além disso, experimentos *in vivo* mostraram que a LQB-118 possui um interessante efeito antineoplásico, sendo capaz de reduzir significativamente a massa e o tamanho do melanoma.

BC15

ONDAS ESPIRAIS DE DEPRESSÃO ALASTRANTE CAUSAM DEGENERAÇÃO MACULAR NA RETINA HIPOGLICÊMICA DE PINTO

Menezes-Santos, L.¹, e Rozentel, R.¹

¹*Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil.*

A depressão alastrante (DA) descrita por Aristides Leão (1944) é uma onda maciça e generalizada de despolarização glial e neuronal que pode ser demonstrada em várias espécies. Ela resulta num colapso temporário dos gradientes iônicos e do potencial transmembrana e é caracterizada por um potencial de campo negativo de 10-20 mV de amplitude e 1-2 min de duração, propagando-se a uma velocidade de alguns milímetros por minuto. Os mecanismos que levam ao surgimento de ondas espontâneas de DA e desenvolvimento de lesões secundárias ainda não são conhecidos. Nesse trabalho mostramos que a hipoglicemia facilita a deflagração de episódios espontâneos de DA, que causam lesões pontuais na região correspondente à mácula em retina de pinto. Essas lesões passam então a funcionar como ponto de origem para a geração de ondas de DA espirais reentrantes que progressivamente aumentam as lesões. Essas observações indicam um papel em potencial da DA no surgimento e na progressão da degeneração de mácula, uma das principais causas de incapacidade visual no mundo.

BP04

A BACTÉRIA ENDOFÍTICA GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS AUXILIA A CANA-DE-AÇÚCAR NA TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO?

Vargas, L., Rojas, C.A., Ferreira, P.C.G. e Hemerly, A.S.

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

A cana-de-açúcar é uma commodity cada vez mais importante ao nível global, pois representa hoje uma fonte viável de combustível alternativo – o etanol. Diante do crescimento dessa indústria nas regiões nordeste e sul do país, se fazem necessários estudos objetivando o aumento da biomassa em menor área plantada e aumento da tolerância da cana em estresses como seca e frio, com menor custo para produção. A cana-de-açúcar é naturalmente colonizada por bactérias endofíticas que auxiliam na absorção de nutrientes (ex. nitrogênio) e fornecem alguns hormônios (ex. auxina) para o hospedeiro. A associação da cana com essas bactérias aumenta a biomassa vegetal, desenvolvimento de raízes laterais e, possivelmente, tolerância a tipos de estresse. Neste trabalho objetiva-se estudar os efeitos da associação de *Glucanacetobacter diazotrophicus* com cana-de-açúcar no déficit hídrico. Plantas de cana-de-açúcar SP 701143 advindas de cultura in vitro foram transferidas para hidroponia e inoculadas ou não com *G. diazotrophicus* PAL5 por 7 dias. Após o período de inoculação, as plantas foram transferidas para substrato com areia e vermiculita (2:1) e divididas em quatro grupos: inoculadas submetidas ou não à falta de água, e não inoculadas submetidas ou não ao estresse. Análises de crescimento das plantas e coletas de material vegetal foram feitas após 3 e 7 dias, e após 1 mês de estresse. Ao final do experimento, somente as plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* sobreviveram em situação de seca. Raiz e parte aérea foram congeladas em nitrogênio líquido separadamente, o RNA foi extraído e o padrão global de expressão gênica será analisado por sequenciamento RNAseq (Illumina). Resultados prévios em qRT-PCR demonstram que a quantidade relativa da bactéria é maior na raiz e aumenta em situação de estresse. Esses dados iniciais sugerem que a colonização de cana-de-açúcar com a bactéria diazotrófica endofítica pode participar de mecanismos de tolerância à seca nos vegetais. **Financiadores:** FAPERJ, CAPES, INCT, CNPq.

CARACTERIZAÇÃO DA REDE REGULATÓRIA DE AIP1

Brasil, J.N. e Hemerly, A.S.

Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Instituto de Bioquímica Médica, CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

ABAP1 (Armadillo BTB Arabidopsis Protein 1) é uma nova proteína regulatória recentemente identificada pelo nosso grupo envolvida no controle de dois processos celulares vitais – a replicação e transcrição do DNA. Essa proteína participa da rede de sinalização que controla a progressão do ciclo celular da fase G1 para S, pela integração dos sinais de desenvolvimento da planta com os controles de replicação e transcrição. ABAP1 provavelmente tem diferentes funções na planta dependendo das proteínas com as quais interage, e o momento e o local da interação. ABAP1 se liga a fatores transcricionais e regula negativamente a transcrição de genes essenciais para o pre-RC, além de se ligar a membros do próprio complexo. Em adição aos fatores de transcrição envolvidos diretamente na regulação da divisão celular, nosso grupo também encontrou prováveis proteínas remodeladoras da cromatina envolvidas neste processo. Nosso laboratório identificou ABAP1 Interacting Protein 1 (AIP1), uma proteína que possui domínios Agenet, pertencente a família Royal, conhecida pelo envolvimento em processos de remodelamento da cromatina. AIP1 também interage com LHP1, uma proteína bem conhecida pela capacidade de reconhecer e se ligar a aminoácidos metilados em caudas de histonas. Neste trabalho fizemos uma ampla análise in silico da expressão dos ligantes de AIP1, procurando por subcomplexos onde AIP1 pode atuar na regulação do desenvolvimento vegetal. Nossos dados preliminares sugerem que AIP1 pode atuar como remodelador da cromatina e sinalizador que controla o desenvolvimento vegetativo, o florescimento e a embriogênese. **Apoio:** CNPq, FAPERJ e CAPES.

CARACTERIZAÇÃO DA VIA DE REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DE AIP1

Primo, L.M.F.^{1,2}, Brasil, J.N.² e Hemerly, A.S.²

¹*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,*

²*Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Instituto de Bioquímica Médica, CCS - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.*

Em organismos multicelulares, além da atividade regulatória dos complexos mecanismos clássicos de regulação gênica, incluindo uma variedade de fatores de transcrição, a estrutura da cromatina está intimamente ligada à atuação de mecanismos epigenéticos. Mais ainda, o silenciamento epigenético e a repressão da hereditariedade da transcrição são importantes para a regulação da expressão gênica, manutenção da estabilidade genômica e determinação do destino celular. Além de fatores de transcrição envolvidos diretamente na regulação da divisão celular, nosso grupo também encontrou prováveis proteínas remodeladoras da cromatina envolvidas neste processo. Dentre elas foi identificada a ABAP1 Interacting Protein 1 (AIP1), uma proteína que se liga a ABAP1, regulador negativo da formação do complexo pré-replicativo na transição da fase G1 para S do ciclo celular. AIP1 possui domínios Agenet, pertencente à família Royal, conhecida pelo envolvimento em processos de remodelamento da cromatina através do reconhecimento e ligação a aminoácidos metilados em caudas de histonas. Na tentativa de obter dados sobre genes e/ou processos do desenvolvimento vegetal que poderiam estar regulando AIP1, fizemos uma extensa análise in silico buscando por plantas com genes com níveis de expressão modificados (incluindo mutantes de perda de função e superexpressões) que possuem alteração no padrão de expressão de AIP1. Nossos dados mostram que Agamous-like 18 (AGL18), ABA hypersensitive 1 (ABH1) e Bolita são fatores de transcrição cuja a mutação afeta diretamente a expressão de AIP1, sugerindo seu envolvimento em processos regulatórios desse gene. **Apoio:** CNPq, FAPERJ e CAPES.

EGD01

“APRESENTAMOS: AS ENZIMAS” – ELABORAÇÃO DE DVD EDUCACIONAL E DE CAPACITAÇÃO PROFISSIONAL

Mazza, I.¹, Oliveira, F.¹, Oliveira, P. S.¹, Carvalho, P. S.¹, F. Maciel, D.¹, Andrare, V.¹, Utagawa, C. Y.^{1,2} e Bianconi, M.L.¹

¹Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil,

²Centro Universitário de Volta Redonda – UNIFOA.

O Ensino de Ciências de qualidade proporciona o entendimento de fenômenos e acontecimentos do cotidiano, fundamental para a estruturação da sociedade. Nosso grupo está desenvolvendo DVDs de divulgação científica que oferecem subsídios a alunos de graduação e profissionais da área que buscam formação continuada. Os dois DVDs abordando o tema “enzimas” estão em processo de filmagem e avaliação. A linguagem de fácil compreensão, está associada a vídeos, animações e fotos para ilustrar os fenômenos abordados. O DVD para alunos de graduação e professores de Ensino Médio contará com fundamentação teórica, experimentos de baixo custo, explicações e curiosidades pertinentes ao tema. Os experimentos podem ser realizados sem a necessidade de laboratórios e material específico, fatores que, muitas vezes, inviabilizam o uso de atividades experimentais nas escolas e Universidades. O material analisado teve ótima aceitação na primeira etapa de avaliação, realizadas por licenciandos da área biológica. O DVD direcionado a profissionais da área de Saúde apresentará uma abordagem clínica, com a descrição de enzimopatias através de mapas conceituais animados. Esse tipo de material é importante tanto para o ensino quanto para a divulgação científica, pois permite que um número expressivo de pessoas tenha contato com informações que não constam em livros textos. Além disso, permite a demonstração de equipamentos que não são encontrados em laboratórios didáticos. O uso da tecnologia em forma de multimídia pode colaborar para um ganho conceitual significativo, por levar aos profissionais e futuros profissionais um conteúdo de qualidade, com informações atualizadas. O tema “enzimas” foi escolhido por despertar interesse e curiosidade, já que faz parte do cotidiano e tem grande importância biotecnológica. **Apoio Financeiro:** FAPERJ e PR5/UFRJ.

EGD02

O MÉTODO CIENTÍFICO NA EDUCAÇÃO DE SURDOS: ESPAÇO DE CIÊNCIAS DO 1º SEGMENTO DO ENSINO FUNDAMENTAL

Flores, A.C.F.

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

O Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e o Instituto Nacional de Educação de Surdos (INES) ao firmarem parceria e promoverem o primeiro Curso de Extensão Experimental Piloto para Surdos do Ensino Médio. Foi visto como oportuno iniciar um projeto piloto de Ciências voltado para as primeiras séries do Ensino Fundamental (antigo primário), com o foco inicial nas turmas do 5º ano (4ª Série). Este projeto de Iniciação à Ciência Experimental Bilingüe, realizado na Língua de Brasileira de Sinais como Primeira Língua e que tem a Língua Portuguesa, na Modalidade Escrita, como segunda Língua, nas séries iniciais, tem o objetivo de organizar um espaço para buscar o desenvolvimento de idéias e reflexões, no intuito de promover de forma lúdica o levantamento de questionamentos e curiosidades com negociação em Libras - Língua Brasileira de Sinais. Assim, buscar-se-á o estímulo a busca e aquisição do conhecimento dos alunos e a oferta aos professores que acompanham seus alunos e graduandos, um caminho para repensar a Prática Pedagógica. A metodologia experimental e as atividades lúdicas são utilizadas como um incentivo ao pensamento científico e a aprendizagem da “Ciência fazendo Ciência”. Desse modo, mesmo com resultados parciais, acredita-se que o Conhecimento Científico pode promover a Inclusão Social, sendo envolvido no cotidiano e vista de forma prazerosa por todos os pares. E o Espaço, organizado para o desenvolvimento de experiências, visto antes, como um lugar distante da realidade do aluno, vem se tornando, nos primeiros anos do Ensino Básico, “um lugar comum” onde a Ciência é foco de grande interesse para os alunos do Centro de Referência Nacional de Educação de Surdos.

Quinta-feira (22/09)

LEGENDA:

BMV - Bioquímica de Microorganismos e Vírus | **BM** - Bioenergética e Membranas | **BF** - Bioquímica de Processos Homeostáticos e Fármacos | **BI** - Bioquímica de Insetos | **BE** - Bioquímica Estrutural | **BC** - Biologia Celular | **BP** - Bioquímica de Plantas | **EGD** - Educação e Divulgação

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE IMUNOGÊNICA DO VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA H3N8 INATIVADO POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

Barroso, S. P. C.¹, Nico, D.², Vicente, A. C. S.¹, Couceiro, J. N. S. S.²,
Palatnik-de-Sousa, C. B.², Silva, J. L.¹ e Oliveira, A. C.¹

¹Instituto de Bioquímica Médica - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ),

²Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - UFRJ,
Rio de Janeiro, Brasil.

O vírus da influenza pertence à família Orthomyxoviridae. O vírus H3N8 é encontrado em aves, cavalos, cachorros e mais recentemente em gatos. Neste trabalho, utilizamos alta pressão hidrostática (APH) com o objetivo de inativação do vírus, sem danos à atividade da hemaglutinina e da neuraminidase. Nosso objetivo é avaliar a capacidade imunogênica e protetora do vírus pressurizado (por 12 h) na ausência e presença de adjuvante (saponina) em modelo murino. Para tal, camundongos Balb/c foram tratados, por via intranasal, com 3 doses de 104,5 TCID₅₀ de vírus ou 104,5 TCID₅₀ de vírus + saponina, saponina ou salina. Após a vacinação, os camundongos foram desafiados e monitorados para: anticorpos vírus-específicos (ELISA), células T CD4⁺ e CD8⁺ vírus-específicas, citocinas (ELISA e dupla marcação celular) e sinais clínicos. Após a imunização, observamos um aumento de anticorpos IgG1 e IgG2a no soro dos grupos vírus e vírus + saponina. Nesses mesmos grupos estava aumentada a produção de IgA no lavado nasal. A análise celular mostra aumento da produção de IL6 e INF γ . Duas semanas após o desafio, observamos o aumento na produção de anticorpos e das interleucinas 2, 4, 6 e TNF α . Após o desafio, os grupos salina e saponina apresentaram mais sinais clínicos indicativos de doença (mudança na pelagem, letargia, perda de peso e huddling) que os animais vacinados (vírus e vírus + saponina). Os resultados indicam que os animais estão tendo resposta satisfatória após vacinação e sendo protegidos contra o desafio. Atualmente estamos verificando se os anticorpos produzidos são neutralizantes. Avaliaremos também carga viral nos camundongos e se a resposta imune é duradoura. Nosso trabalho reafirma o uso da APH como uma poderosa ferramenta no desenvolvimento de vacinas virais com baixo custo e boa resposta imune. **Suporte:** CAPES-FAPERJ-CNPq-INBEB.

BMV11

EFEITO DA LACTOFERRINA BOVINA SOBRE A INFECÇÃO DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA

Mendes, Y.S.¹, **Ferreira, M.V.M.¹**, Alves, N.S.¹, Carvalho, C.A.M.¹, Schwarcz, W.D.², Silva, J.L.³, Gonçalves, R.B.⁴, Gomes, A.M.O.¹ e Oliveira, A.C.¹

¹LABEV - Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ,

²LATEV - Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/FIOCRUZ,

³LTPV - Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ,

⁴LAAB - Departamento de Bioquímica/UNIRIO. Rio de Janeiro – Brasil.

O Vírus da Febre Amarela (YFV) é um arbovírus endêmico em regiões tropicais, como África e América do Sul, sendo responsável por epidemias esporádicas e consequentemente por um grande impacto na saúde pública. Atualmente, ainda não há um tratamento eficaz contra as infecções causadas por esses vírus pertencentes ao gênero Flavivírus (família Flaviviridae), assim como o vírus da Dengue. A Lactoferrina (Lf) é uma glicoproteína multifuncional ligadora de ferro, encontrada em diversas secreções como leite, saliva e lágrima. Lf apresenta diversas atividades biológicas como metabolismo do ferro, imunomodulação e atividade antimicrobiana, incluindo a atividade contra diversas bactérias, fungos, protozoários e vírus. Nosso trabalho tem como objetivo elucidar a atividade antiviral e os mecanismos pelos quais a lactoferrina bovina (bLf) atua contra a infecção causada pelo YFV. Nossos dados de ensaio de infecciosidade mostram que a bLf é capaz de inibir significativamente a infecção por YFV em células VERO, sem causar efeitos citotóxicos. Outros ensaios, utilizando diversas abordagens, têm sido realizados visando compreender o mecanismo pelo qual essa inibição ocorre, se durante a adsorção e/ou replicação viral. Para investigar uma possível diminuição da carga viral decorrente do tratamento com bLf, o RNA viral foi quantificado por RT-PCR. Nossos dados indicam que a bLf é capaz de inibir a infecção pelo YFV, principalmente em etapas iniciais. Dessa forma, devido à ausência de terapias antivirais efetivas, a descoberta de novas drogas antivirais é de extrema importância, visando minimizar os sintomas e o grau de mortalidade dessa doença. **Suporte:** CNPq/CAPES/FAPERJ/PRONEX/INBEB.

BMV12

USO DA ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA NA INATIVAÇÃO E ESTUDO DA ESTABILIDADE ESTRUTURAL DO VÍRUS DA INFLUENZA HUMANA X-31

Dumard, C.H.¹, Souza-Santos, P.¹, Barroso, S.P.C.¹, Couceiro, J.N.S.S.², Ferreira, D.F.², Oliveira, A.C.¹ e Silva, J.L.¹

¹*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil,*

²*Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

A gripe é uma doença respiratória aguda causada por vírus pertencentes à família Orthomyxoviridae. São vírus envelopados de RNA fita simples de polaridade negativa que podem ser distinguidos por diferenças nas proteínas do nucleocapsídeo (N) e da matrix (M). A hemaglutinina (HA) a neuraminidase (NA) e a proteína M2 estão inseridas no envelope viral e são essenciais para a infecção. Para inativar e estudar a estabilidade dos vírus utilizamos a alta pressão hidrostática (42Kpsi) em diferentes intervalos de tempo (3h, 6h e 12h). Alterações estruturais foram acompanhadas por técnicas espectroscópicas, microscopia eletrônica e espalhamento de luz dinâmico (DLS). A inativação foi avaliada por título hemaglutinante, atividade neuraminidásica, microscopia confocal e infeciosidade em cultura de células. As amostras pressurizadas mostraram alterações estruturais que foram detectadas por queda na emissão de fluorescência e por alterações morfológicas detectadas por microscopia eletrônica. Um discreto aumento na média do tamanho das populações virais foram observadas por DLS. O título hemaglutinante em todos os intervalos de tempo diminuiu, mas nenhuma alteração significativa da atividade neuraminidásica foi observada. A infeciosidade em célula foi abolida quando analisada por TCID50 e por passagem cega. Quando analisado por microscopia confocal o vírus teve sua atividade fusogênica diminuída. A alta pressão hidrostática mostrou ser um eficiente método para estudar e inativar o vírus da influenza. Este método apresenta a vantagem de utilizar partículas virais inteiras, que já foi descrito na literatura por ser mais imunogênico que as vacinas de fragmentos virais purificados que é atualmente utilizada.

BMV15

ATIVIDADE PDC1 DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE É INDUZIDA POR FOSFORILAÇÃO E REGULADA INDIRETAMENTE PELA SER/THR FOSFATASE SIT4

Assis, L.J., Masuda, C.A. e Montero-Lomeli, M.

Instituto de Bioquímica Médica - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Brasil.

Piruvato descarboxilase (Pdc) é uma enzima chave na fermentação alcoólica em leveduras convertendo o piruvato a acetaldeído com a liberação de CO₂, sendo este acetaldeído produzido convertido a etanol pela álcool desidrogenase. A serina/treonina fosfatase Sit4, uma enzima que regula diversos processos biológicos importantes como integridade da parede celular, ciclo celular, metabolismo de glicogênio e metabolismo de lipídeos, participa da regulação da fermentação e possivelmente da regulação da piruvato descarboxilase. No entanto, não existem evidências de uma regulação de Sit4 sobre Pdc1. Neste trabalho mostramos que Pdc1p é regulada por fosforilação em resíduos de serina e o estado de fosforilação de Pdc1p é dependente da quantidade de nutrientes disponíveis. A deleção do gene SIT4 gera um atraso na fosforilação durante o crescimento da levedura e uma redução na atividade de piruvato descarboxilase, como consequência disso temos uma menor quantidade de etanol produzido. **Palavras-chave:** Sit4, Pdc1, fermentação, etanol, fosfatase.

ESTUDO DO METABOLISMO MITOCONDRIAL DO HELMINTO SCHISTOSOMA MANSONI

Oliveira, M.P., Gonçalves R.L.S. e Oliveira, M.F.

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Mitocôndrias desempenham diversos papéis biológicos e representam os principais locais não somente da produção aeróbica de ATP, mas também da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). O helminto *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose humana, requer dois hospedeiros distintos: os caramujos planorbídeos, no estágio aquático de vida, e o homem, nas formas adultas. Diversas evidências indicam que mudanças metabólicas substanciais ocorrem nos vermes ao longo do ciclo de vida, de maneira que as cercárias apresentam um metabolismo essencialmente oxidativo, enquanto as formas adultas apresentam um metabolismo mais fermentativo. Assim, no presente trabalho, investigamos a função mitocondrial em machos adultos (MA) e fêmeas adultas (FA) do *S. mansoni*. As Taxas de Consumo de Oxigênio (TCO) em parasitas intactos foram avaliadas através de respirometria de alta resolução. Observamos que as TCOs de FA representam cerca de 53% dos valores obtidos em MA. Curiosamente, a Antimicina A (AA), inibidor do complexo III da Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) mitocondrial, exerceu um efeito inibitório sobre a respiração das FA menor (63%) comparado ao efeito observado nos MA (87%). Estes dados indicam que o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias em MA é maior que em FA. Além disso, os dados mostram que FA apresentam um consumo de oxigênio considerável por vias não mitocondriais. As atividades do complexo da citocromo c oxidase (CCO) entre MA e FA normalizadas pela atividade da enzima citrato sintase (CS) mostraram-se expressivamente maiores em MA do que nas FA. A análise da produção de peróxido de hidrogênio também apresentou valores maiores em FA. Por fim, observamos que a captação de glicose nas FA é muito maior do que nos MA. Os dados obtidos neste trabalho indicam que existe uma diferenciação nos mecanismos metabólicos envolvidos na transdução de energia livre nas formas adultas (MA e FA) do helminto *S. mansoni*, sendo a função mitocondrial mais importante para os MA do que FA.

BM07

ESTUDOS SOBRE ALTERAÇÕES NO METABOLISMO ENERGÉTICO E REDOX DISPARADOS POR ESTÍMULOS PRÓ-COAGULANTES EM PLAQUETAS HUMANAS

Garcia-Souza L.F.¹, Hottz E.D.², Morton K.A.³, Santiago A.P.S.A.¹, Bozza F.A.² e Oliveira M.F.¹

¹*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,*

²*Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil,*

³*Department of Radiology, University of Utah, Salt Lake City, EUA.*

Ativação plaquetária mediada por fatores pró-coagulantes desencadeiam vias intracelulares e mudanças no metabolismo energético que não são totalmente compreendidos. Aqui, nós investigamos se a ativação plaquetária poderia afetar a função mitocondrial. Plaquetas humanas foram coletadas de voluntários saudáveis, isoladas em meio M199, desafiadas por diferentes concentrações de trombina e vários parâmetros mitocondriais foram avaliados por citometria de fluxo e respirometria de alta resolução. Observou-se que a ativação por baixas doses de trombina (0-0,3 U/mL) aumentou de glicose induzida paralela consumo de oxigênio a uma redução do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). Este efeito foi fortemente inibido por ciclosporina, implicando a necessidade da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) neste processo. Em doses mais elevadas de trombina (0,4-1,0 U mL) mudanças em ambos os parâmetros foram menos pronunciadas, sendo indistinguíveis de plaquetas em repouso em 1,0 U/mL trombina. Curiosamente, nesta condição, a manutenção do $\Delta\psi_m$ envolve o comprometimento parcial da cadeia de transporte de elétrons pelo óxido nítrico e a reversão da atividade F1Fo da ATP sintase, sendo que o $\Delta\psi_m$ colapsou na presença de oligomicina. Nossos dados indicam que a ativação plaquetária promove remodelação mitocondrial funcional que, dependendo da intensidade do estímulo, pode envolver a abertura MPTP ou reversão da atividade F1Fo da ATP sintase.

ESTUDOS SOBRE AS MUDANÇAS DINÂMICAS DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL APÓS UMA REFEIÇÃO DE SANGUE NO INSETO RHODNIUS PROLIXUS

Pinho, J.P.C., Gonçalves, R.L.S. e Oliveira, M.F.

Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, RJ, Brasil.

As implicações fisiológicas de hematofagia em artrópodes levam o interesse nesses organismos porque muitos deles são vetores de doenças importantes. Há evidências mostrando que organismos hematófagos desenvolveram mecanismos de adaptação para evitar os produtos tóxicos da digestão de sangue. Dado que o metabolismo oxidativo é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS), investigamos a hipótese de que o inseto *Rhodnius prolixus* poderia modular sua função mitocondrial após um repasto sanguíneo (ARS). Nós empregamos respirometria e espectrofluorimetria para avaliar o consumo de oxigênio e geração de peróxido de hidrogênio em músculo de voo de fêmeas adultas de *R. prolixus*, respectivamente. Observamos nos insetos diminuição da respiração e da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em vários estados metabólicos mitocondriais ABM. As atividades dos complexos I-III e IV não foram distintas ABM, indicando que a cadeia respiratória não estava envolvido nas reduzidas taxas de respiração observadas. O consumo de sangue causou uma redução reversível no consumo de oxigênio mitocondrial, um evento que foi paralelo à digestão de sangue, sendo mais intensa 7 dias ABM. Observamos também uma diminuição em 78% e 65% na respiração induzida por ADP e desacoplada respiração, durante todo o tempo de vida do inseto. Concluímos que a alimentação de sangue desempenha um papel importante na regulação da função mitocondrial e pode representar uma importante adaptação desse inseto para hematofagia. **Apoio:** CAPES, CNPq, FAPERJ. **Palavras-chave:** hematofagia, mitocôndrias, ROS.

ENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASES NA VITELOGÊNESE DE AEDES AEGYPTI

Moretti, D.M.¹, Nunes, R.D.¹, Cudishevitch, C.O.¹, Gazos-Lopes, F., Madan, L.L.³, Senna, R.¹, Mesquita, R.², Sorgine, M.H.¹ e Silva-Neto, M.A.¹

¹Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ,

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro,

³Unidade Molecular de Biofísica, Instituto de Ciência da Índia, Bangalore, Índia.

A transmissão de patógenos por mosquitos implica na fina sintonia entre o ciclo do patógeno e o ciclo de vida do hospedeiro invertebrado. Em mosquitos de importância médica, como o *A. aegypti*, a via de insulina modula sua longevidade assim como outros processos importantes para a capacidade vetorial do mosquito. Nos últimos 15 anos foram descritos diversos integrantes canônicos desta via, mas pouco se sabe sobre seus reguladores negativos, ambos pertencentes à família de tirosina fosfatases (PTPs), sendo o principal regulador a PTP1B. Através da bioinformática, foi identificado o gene AAEL001919 que apresenta 53% de identidade com a PTP1B humana. Deste modo, o objetivo deste trabalho é testar o envolvimento de PTPs na vitelogênese do *A. aegypti*. Os resultados mostram que, em três tecidos envolvidos na digestão do sangue e vitelogênese, corpo gorduroso, ovários e intestino médio, há uma redução da atividade fosfatásica 24h após a alimentação com sangue, havendo uma recuperação dessa atividade 72h após a alimentação – no fim do período vitelogênico, após a postura de ovos. Paralelamente, a fosforilação em tirosina vista por western blotting aumenta 24h após a alimentação com sangue e diminui 72h após a alimentação. Tal sinalização parece importante para a vitelogênese uma vez que o tratamento com inibidores das PTPs alterou temporal e quantitativamente este processo. Para testar o envolvimento direto de tirosina fosfatases nessa modulação do padrão de fosforilação, foi analisada a expressão de duas tirosina fosfatases, as duas mais expressas em todos os tecidos – AAEL001919/AaPTPn1 e AAEL003108/AaPTPn3, sendo ambas moduladas pela alimentação principalmente no corpo gorduroso e ovários. Podemos então concluir que a fosforilação em tirosina é importante para a sinalização mediada pela alimentação com sangue, principalmente para a vitelogênese do mosquito. Desta forma, interferências na atividade das PTPs podem sinalizar para um novo campo do controle vetorial.

RESPOSTA INATA IMUNE EM AEDES AEGYPTI E SUA RELAÇÃO COM ESTADO NUTRICIONAL

Silva, B.A., Barletta, A.B.F. e Sorgine, M.H.F.

Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Aedes aegypti é um importante vetor de numerosos arbovirus, muitos dos quais representam preocupações para a saúde pública. Target of Rapamicina (TOR) é um membro da super-família fosfatidilinositol-3-quinase. A via TOR é reconhecida como um importante sensor de nutrientes e sua ativação pode ser induzida por hormônios e pelo aumento da concentração de aminoácidos no interior da célula. Esta via é capaz de realizar diferentes funções como regular a biossíntese de proteínas e diferenciação celular através de mecanismos de modificações transcricionais, traducionais e pós-traducionais. Em *Drosophila melanogaster*, foi demonstrado que o fator de transcrição GATA, uma proteína downstream a via TOR, é importante para a regulação da expressão de alguns genes antimicrobianos. Nosso objetivo foi analisar se a expressão de peptídeos antimicrobianos e proliferação bacteriana intestinal seria modulada por TOR em mosquitos *Aedes aegypti*. Mosquitos foram injetados com dsRNA para TOR, e alimentados com sangue 3 dia após a injeção. Vinte quatro horas após a alimentação foram dissecados os intestinos e corpos gordurosos para análise tanto da expressão dos genes que codificam peptídeos antimicrobianos quanto da proliferação bacteriana no intestino por qPCR. Um aumento significativo na proliferação de bactérias foi observado no intestino dos mosquitos injetados com dsTOR. Este aumento foi acompanhado por uma queda nos níveis de expressão dos peptídeos cecropin G, attacina e defensina, sugerindo que a inibição de TOR pode modular vias imunes do *Aedes*. Estes resultados suportam a idéia de que há um cross-talk entre o estatus nutricional e imunidade em mosquitos *Aedes aegypti*.

SOBRE OS MECANISMOS FISIOLÓGICOS DE CRISTALIZAÇÃO DO HEME NO INSETO RHODNIUS PROLIXUS

Ferreira, C.M.¹, Stiebler, R.¹ e Oliveira, M.F.¹

¹Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Os organismos hematófagos digerem hemoglobina e liberam no trato digestório grandes quantidades de heme que, no estado livre, é tóxico, levando à desestabilização de membranas e potencializando a geração de espécies reativas de oxigênio. A cristalização de heme na forma de hemozoina (Hz) representa um eficiente mecanismo de detoxificação desta molécula. No triatomíneo *Rhodnius prolixus*, a digestão do sangue e a cristalização do heme ocorrem no intestino posterior do inseto, em condições levemente ácidas, sendo mediada pelas membranas perimicrovillares. Neste ambiente o heme é insolúvel, o que impediria sua cristalização. Dados anteriores do nosso grupo demonstram que a manutenção de pequenos níveis de heme em solução, em ambientes ácidos, favorece sua cristalização *in vitro*. Além disso, 97% do ferro presente no intestino do inseto encontra-se na forma de Hz. Levando em conta estes dados, um dos nossos objetivos foi estudar como ocorre a solubilização do heme no trato digestório de *R. prolixus*. Nosso grupo acredita que exista uma molécula neste tecido que seja capaz de transportar o heme de forma solúvel até a membrana perimicrovillar, favorecendo a formação de Hz. A incubação de heme em meio ácido na presença de albumina causou um aumento de maneira dose-dependente da banda de Soret, característica do espectro de absorção de heme, nas frações solúveis, indicando uma maior quantidade de heme em solução. Em paralelo, avaliamos possíveis alterações fisiológicas conferidas pela inibição da formação de Hz utilizando drogas antimaláricas quinolínicas. A alimentação do inseto com quinidina inibiu a formação do cristal *in vivo* de forma dose dependente, aumentou a peroxidação lipídica na hemolinfa e levou a uma diminuição da postura de ovos. Assim, podemos concluir que o aumento da solubilidade do heme pela albumina favorece a formação de Hz e que a inibição da formação de Hz resulta em importantes modificações fisiológicas deste inseto.

BE13

EFEITOS DE UM TIOAPTÂMERO DE DNA FITA DUPLA SOBRE O DOMÍNIO CENTRAL DA PROTEÍNA P53

Rangel, L.P., **Alves, P.R.**, Ano Bom, A.P.D. e Silva, J.L.1*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.*

A p53 é uma proteína supressora de tumores que atua como fator de transcrição, sendo capaz de levar à parada do ciclo celular, culminando no processo de apoptose. Já foi demonstrado anteriormente que uma sequência consenso de DNA de dupla fita é capaz de estabilizar, prevenir o envelhecimento e a agregação do domínio central da p53. Tioaptâmeros são ácidos nucleicos com ligações do tipo fosforotioato em substituição às ligações fosfodiéster, o que os torna resistentes a nucleases e aumenta sua afinidade na ligação a proteínas. Neste trabalho, utilizamos uma sequência consenso capaz de ligar à p53, convertida em tioaptâmero, para observar seus efeitos sobre a conformação do domínio central da p53. A utilização deste aptâmero levou a um aumento na estabilidade desta proteína quando desnaturada, tanto por pressão como por temperatura, em comparação a uma sequência poliGC. Além disso, experimentos com os mutantes "hot-spot" R248Q, um mutante de contato, e R175H, um mutante estrutural, foram realizados. Nestes experimentos, foi avaliado o espectro de fluorescência do domínio central da p53, com comprimento de onda de excitação em 278nm e de emissão de 295 a 415nm. As alterações nos espectros foram avaliadas através de mudanças no centro de massa. As variações no espalhamento de luz com comprimento de onda de excitação em 320nm e emissão de 300 a 340nm também foram observadas. Os experimentos de cinética de agregação por temperatura foram analisados através do espalhamento de luz, com comprimento de onda de excitação e emissão em 320nm. O tioaptâmero de DNA consenso utilizado neste trabalho demonstrou ser capaz de promover a recuperação da estrutura da p53 após a desnaturação por pressão e temperatura. Sendo assim, acreditamos que esta classe de biomoléculas pode representar uma importante promessa na terapia anticâncer e estudos complementares estão em curso para a caracterização de seu efeito.

BE14

APRISIONANDO O MONÔMERO DA VARIANTE NÃO AMILOIDOGENICA DA TRANSTIRETINA: POSSÍVEL TERAPIA CONTRA A POLINEUROPATIA AMILOIDOTICA FAMILIAR

Fontes, L.A.S., Palhano, F., Braga, C.A. e Foguel, D.*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

A Transtiretina (TTR), um homotetrâmero de 55kDa rico em folha beta, é responsável pelo transporte de tiroxina e retinol no plasma e fluido cérebro espinhal. Mais de 100 mutações pontuais na TTR foram associadas com a forma hereditária de amiloidose, denominada Polineuropatia Amiloidótica Familiar (FAP), pelo qual é caracterizada por depósito de agregados no sistema nervoso periférico. Esses agregados são formados após a dissociação do tetrâmero e posterior envelhecimento parcial do monômero. A mutação T119M foi identificada em uma família com alta incidência da variante amiloidogênica V30M, suavizando os sintomas desta mutação agressiva. Desta forma, a incorporação de subunidades monoméricas de T119M em um tetrâmero com a mutação V30M pode ser uma estratégia para estabilizar o heterotetrâmero e inibir a agregação. Neste presente estudo, alta pressão hidrostática (HHP) foi utilizada como uma ferramenta para a produção de monômeros de T119M. Visto que a T119M é um tetrâmero altamente estável, os experimentos foram feitos em pH 3.0, 3.000 atm e 1°C. Objetivando o desenvolvimento de uma nova forma de terapia contra FAP, é necessário manter este monômero solúvel em pH fisiológico (condição alcançada com pH 7.8). Em seguida, nós avaliamos o estado de envelhecimento comparando o M-T119M com o monômero engenheirado envelhecido Wild-Type (M-TTR) utilizando alta pressão hidrostática como agente desnaturante. Após, investigamos a cinética de re-associação desses monômeros em tetrâmeros a fim de identificar uma janela de tempo em que esses monômeros possam ser combinados com os tetrâmeros altamente amiloidogênicos permitindo a troca de subunidades (trans-supressão in vitro). Nossos resultados mostram que há retetramerização em aproximadamente 10 horas. Entretanto, ao ser colocado na presença de tetrâmeros da variante amiloidogênica V30M, o M-T119M não foi capaz de diminuir a cinética de agregação desta variante, pois, ao ser submetido a condição ideal para agregação (37°C, pH 4.4) formou agregados. Em seguida testamos a ação de possíveis inibidores em bloquear a agregação deste monômero e investigamos se o protocolo de monomerização descrito neste trabalho poderia estar formando espécies monoméricas estruturalmente alteradas. Os resultados mostram que os compostos testados não foram capazes de inibir a agregação do M-T119M, assim como o protocolo de monomerização em pH 3.0 produz uma espécie monomérica estruturalmente similar a espécie descrita pelo grupo. Como perspectivas, objetivamos alcançar uma condição em que o M-T119M consiga retetramerizar sem formar agregados.

BE16

ESTUDOS ESTRUTURAIS COM O FATOR NEUROTRÓFICO DOPAMINA CEREBRAL (CDNF) E SEU EFEITO NEUROPROTETOR CONTRA A TOXICIDADE DOS OLIGÔMEROS DE ALFA-SINUCLÉINALatgé, C.¹, **Rosa, A.**¹, Braga, C.A.¹, Cabral, K.¹, Romão, L.², Almeida, M.S.¹ e Foguel, D.¹¹Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ, Rio de Janeiro,²Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, Rio de Janeiro.

A doença de Parkinson é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra do cérebro. Atualmente não há tratamento com real eficácia para esta doença que é o segundo distúrbio neurodegenerativo mais prevalente em todo o mundo. Os fatores neurotróficos promovem a diferenciação, sobrevivência e manutenção de neurônios do sistema nervoso dos vertebrados. Um fator neurotrófico recentemente descrito é o fator neurotrófico dopamina cerebral (CDNF), porém pouco se sabe sobre sua estrutura e mecanismo de ação. Em nosso trabalho, pretendemos resolver a estrutura atômica e estudar a dinâmica molecular do CDNF em solução por RMN, além de avaliar seu efeito neuroprotetor contra os oligômeros citotóxicos de alfa-sinucleína. Inicialmente, o CDNF (18kDa) foi clonado, expresso e purificado em estado puro e solúvel, assim como em meio marcado com 2H, 13C e 15N. Observamos que a proteína purificada sofria uma proteólise, liberando um fragmento de 6 kDa oriundo de sua porção C-terminal. Desta maneira utilizamos o fragmento de 12 kDa para determinação estrutural. Os resíduos do CDNF foram assinalados por experimentos de tripla ressonância, sua estrutura calculada e resolvida. Investigamos a atividade desse fator frente aos oligômeros de alfa-sinucleína em linhagem dopaminérgica SH-SY5Y pelo método de MTT. Observamos que as células pré-tratadas com 10 µM de CDNF e então incubadas com 140 µM de oligômeros de alfa-sinucleína apresentaram sobrevivência de aproximadamente 80%. No entanto, células tratadas apenas com os oligômeros apresentaram sobrevivência de 50%. Frente a esses resultados, pretendemos realizar ensaios de viabilidade celular pelo método de live/dead e esclarecer as possíveis vias de sinalização ativadas. Nossos dados sugerem que o CDNF é uma proteína bem enovelada com promissora atividade contra os oligômeros de alfa-sinucleína. Mais estudos estão a caminho para desvendar o mecanismo exato de ação do CDNF, o que contribuiria como possível alternativa ao tratamento e elucidação da doença de Parkinson.

BC16

OLIGÔMEROS DO PEPTÍDEO B AMILÓIDE INDUZEM DEFICIT COGNITIVO PERSISTENTE EM CAMUNDONGOS APÓS ADMINISTRAÇÃO ÚNICA VIA INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR**Motta-Sales, A.P.B.**¹, Ribeiro, F.C.², Figueiredo, C.P.² e Ferreira, S.T.³¹Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasi,²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasi,³Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Os sintomas iniciais da Doença de Alzheimer (DA) tem sido atribuídos a toxicidade causada pelo peptídeo β amilóide (A β). A fisiopatologia da DA é complexa e envolve diversas vias bioquímicas distintas, incluindo distúrbios no metabolismo na proteína precursora amiloide (APP), neuroinflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Os oligômeros solúveis do peptídeo A β , também denominados como "ligantes difusíveis derivados do peptídeo A β " (ADDLs), atuam como ligantes patogênicos de alta afinidade, ligando-se a regiões localizadas em sinapses específicas. A ligação dos ADDLs as sinapses inibe a Potenciação de Longa Duração (LTP), um paradigma clássico de mecanismos sinápticos relacionados a memória, ocasionando déficit cognitivo. Neste estudo, nós avaliamos o déficit cognitivo e sináptico em camundongos adultos jovens, induzido por uma única injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de ADDLs (10 ou 50pmol/sítio). Para avaliar a cognição dos camundongos, foi utilizado o teste de reconhecimento de objetos, um paradigma clássico de avaliação de memória hipocampal e cortical. Os resultados obtidos mostram que, após a injeção i.c.v. de addls, ocorre déficit cognitivo significativo após 24h, sete e 14 dias nos animais que receberam ADDLs 50pmol/sítio e após 14 dias nos animais que receberam ADDLs 10pmol/sítio. 15 dias após a injeção, os camundongos foram eutanasiados por perfusão transcardíaca e os cérebros separados para realização de análises histoquímicas ou por decação, seguida de dissecação do hipocampo e coleta do sangue. Um hipocampo é armazenado para análises bioquímicas por imunoblotting e o outro para processamento de cDNA. O soro foi separado do sangue e armazenado para análises bioquímicas. Portanto, devido ao desenvolvimento de déficit cognitivo duradouro, é possível que este seja um novo modelo para o estudo da DA, auxiliando na elucidação de seus mecanismos fisiopatológicos, além de poder ser utilizado no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

BC17

DISTRIBUIÇÃO SELETIVA DOS OLIGÔMEROS DO PEPTÍDEO β -AMILÓIDE APÓS INJEÇÃO NO VENTRÍCULO LATERAL DE RATOS E MACACOS ADULTOS.Forny-Germano L.^{1,2}, **Lyra N.M.S.**¹, Graca, D.F.¹, Brito-Moreira J.¹, Munoz, D.P., Ferreira S.T.¹, Houzel J.C.² e De Felice.F.G.¹¹Instituto de Bioquímica Médica,²LFN, Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ,³Department of Neurobiology and Physiology, Northwestern University, USA,⁴Centre for Neuroscience Studies, Queen's University, Kingston, Canada.

A hipótese atual para a Doença de Alzheimer é de que a mesma seja decorrente da falha sináptica causada pela ligação com oligômeros solúveis de A β . Essas substâncias têm sido mostradas como ligantes patogênicos em culturas neuronais. No presente trabalho investigamos se oligômeros de A β injetados através de cânula intracerebroventricular em ratos (Wistar) e macacos (*Macaca fascicularis*) adultos poderiam difundir e se ligar a neurônios in vivo. Os ratos foram administrados com 1 μ g de oligômeros de A β , 3 dias da semana por 5 semanas, enquanto que, os macacos receberam 100 μ g dos oligômeros a cada 3 dias durante 24 dias. Os cérebros foram fixados, congelados e cortados em fatias coronais de 40 μ m e então, processadas para imuno-histoquímica para oligômeros de A β . Para a detecção de possíveis placas amilóides, os cortes foram também corados com tioflavina S. Nossos resultados demonstram que os oligômeros de A β são capazes de difundir do ventrículo para o parênquima cerebral e ligar a neurônios in vivo. No cérebro de ratos foi observada grande reatividade desses oligômeros foi encontrada no hipocampo, amígdala e córtex frontal. O encéfalo dos macacos apresentou forte marcação no hipocampo, amígdala e núcleos da base. Tais áreas são essenciais para a memória e comportamento operante. Ainda foi encontrada reatividade no córtex somestésico, tálamo e, em pequenas quantidades no córtex visual. No cerebelo não foi encontrada nenhuma reatividade. Nossos resultados demonstraram que os oligômeros de A β podem se ligar seletivamente a regiões relacionadas a cognição in vivo em modelo de roedores e primatas. Essa especificidade regional dos oligômeros pode explicar porque a Doença de Alzheimer em seus estágios iniciais apresenta uma grande perda de memória.

BC19

EFEITO CITOTÓXICO DO ÁLCOOL PERÍLICO EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES DE GLIOBLASTOMA HUMANO

Souza-Souza, K.F.C.¹, Silva, C.I.¹, Garcia, D.G.², Soares, M.A.¹, Amorim, L.M.F.¹, Castro-Faria, M.V.³, Castro-Faria-Neto, H.C.², BURTH, P.¹¹Depto. de Biologia Celular e Molecular / Inst. de Biologia, UFF,²Depto. de Fisiologia e Farmacodinâmica, Fiocruz,³Depto. de Medicina Interna / Faculdade de Ciências Médicas, UERJ.

O álcool perílico (POH), um monoterpene encontrado em alguns extratos vegetais, apresenta potencial atividade regressora de vários tumores, incluindo glioblastomas, que são tumores cerebrais mais malignos e frequentes em humanos. Objetivo: Comparar o efeito citotóxico do POH e do seu principal metabólito ácido perílico (AP) em diferentes linhagens celulares de glioblastoma humano (U87, U251 e GBV). **Material e Métodos:** As células foram expostas a diferentes concentrações de POH (0.5; 1.5; 2.5 e 4.0 Mm) e a uma alta concentração de AP (4.0 Mm) por 24 horas. Após, foi realizado o teste de citotoxicidade através do método da enzima lactato desidrogenase. **Resultados:** Na linhagem GBV, o POH apresentou efeito citotóxico significativo a partir da concentração de 1,5 mM. Nas linhagens U251 e U87 todas as concentrações utilizadas foram citotóxicas. Já o AP não apresentou citotoxicidade relevante em nenhuma das concentrações testadas. **Conclusão:** Todas as linhagens de glioblastoma utilizadas neste trabalho foram sensíveis a ação citotóxica do POH. Porém, o AP, mesmo numa alta concentração, não reduziu a viabilidade destas células. **Apoio Financeiro:** FAPERJ; CNPq; FOPESQ-UFF; CAPES.

ANÁLISE PROTEÔMICA DA URINA DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

Sandim V.^{1,2}, Pereira D.A.^{1,2}, Ornellas A.A.^{3,4}, Alves G.², Zingali R.B.¹

¹UEMP, IBqM-UFRJ,

²Laboratório de Genética Aplicada, INCA, RJ,

³Serviço de Urologia, INCA, RJ,

⁴Serviço de Urologia, Mario Kröeff, RJ.

O Carcinoma de células renais (RCC) é tipo de câncer renal mais comum. A identificação de biomarcadores para o RCC permite o desenvolvimento de métodos para o diagnóstico precoce, detecção de doença metastática e desenvolvimento de drogas alvo específico. Entretanto, até o momento não existe nenhum marcador usado na rotina clínica. Neste estudo, nós identificamos através de técnicas proteômicas proteínas diferencialmente secretadas na urina dos pacientes com RCC células claras, comparando-os com a urina de doadores saudáveis. Os pacientes foram separados em grupos de bom e mau prognóstico de acordo com o grau de Fuhrman. Foram feitos pools com a urina de pacientes e dos doadores saudáveis. As amostras foram submetidas à eletroforese bi-dimensional e as proteínas diferencialmente secretadas foram analisadas por espectrometria de massas. Nossos resultados mostraram algumas proteínas diferencialmente secretadas como a MASP-2, Heparan Sulfato e o Cininogênio 1. Sendo que destas proteínas a MASP-2 teve seu resultado confirmado pela análise em urinas individuais por SELDI-TOF. Neste momento estamos validando este resultado por ELISA, e os resultados obtidos mostram que esta proteína esta com sua secreção diminuída em pacientes com RCC em comparação com os doadores saudáveis, como já havia sido visto pelas outras técnicas. Este achado pode ser muito importante quando consideramos a identificação de um candidato a marcador específico para os tumores renais, de acordo com o tipo histológico ao qual ele pertence. **Financiado por:** CNPQ; FAPERJ e Programa de Oncobiologia. **Palavras-chave:** Carcinoma de células renais, Proteômica e Urina.

BP08

ESTUDO DA VIA DE SINALIZAÇÃO POR NITROGÊNIO EM CANA-DE-AÇÚCAR EM ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

Bomfim, A.C.J.S.¹, Carvalho, T.L.G.¹, Junqueira R.¹, Vicentini, R.², Baldani, J.I.³ e Hemerly, A.S.¹

¹Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21.941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

²Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil,

³Embrapa Agrobiologia, BR465, Km47, 23851-970, Seropédica, RJ, Brasil.

O Brasil se destaca como maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Utilizada como matéria prima pela indústria alimentícia e geração de energia, a cana-de-açúcar é cultivada no Brasil nos solos ácidos com baixa disponibilidade de nutrientes como nitrogênio. Já foi observado que várias cultivares requerem baixo uso de fertilizantes nitrogenados, isto se deve, pelo menos em parte, a um tipo particular de associação com bactérias diazotróficas endofíticas. Dentre os benefícios gerados por essa associação estão a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), aumento de biomassa vegetal, produção de fitohormônios, defesa contra patógenos e tolerância a estresse hídrico. Os mecanismos envolvidos no estabelecimento dessa interação planta/endofítico ainda não estão elucidados. Os genótipos da planta e da bactéria parecem controlar a eficiência da associação, que também é regulada por sinais ambientais tais como status hídrico e composição do solo. O nitrogênio é um macronutriente de função importante no desenvolvimento vegetal estando envolvido na regulação de vários genes do desenvolvimento. O objetivo desse trabalho é investigar a sinalização do nitrogênio no desenvolvimento de cana-de-açúcar mediado pela bactéria diazotrófica endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Foi gerado um transcriptoma de plantas colonizadas ou não pelos endofíticos, de dois genótipos contrastantes quanto a FBN: Chunece (baixa FBN) e SP70-1143 (alta FBN). O transcriptoma está sendo utilizado para identificar e analisar o perfil de expressão dos possíveis genes da via de sinalização do nitrogênio em cana-de-açúcar. Um dos genes já identificado no transcriptoma foi o transportador de nitrato NRT1.1. Observou-se que a expressão de NRT1.1 é maior em SP70-1143 do que Chunece. A resposta a inoculação e a tratamento com nitrogênio foi analisada por qRT PCR. O resultado mostrou uma correlação positiva entre a expressão de NRT1.1 e o número de bactérias. Portanto a expressão relativa de NRT1.1 sugere que a sinalização por nitrogênio é regulada durante a associação com o endofítico.

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA COM BASE NAS ALTERAÇÕES DE METILAÇÃO DE DNA EM ACESSOS DE LIPPIDIA ALBA IN VITRO E ACLIMATADA

Mainenti, J.L.L., Ribeiro, P.C.C., Campos, F.V., Reis, A.C., Campos, J.M.S., Santos, M.O., Viccini, L.F. e Coelho, C.M.

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 36036-900

Várias espécies do gênero *Lippia* sp são utilizadas na medicina popular devido atividades antimicrobianas apresentada por seu óleo essencial. Estudos em plantas feitos com cultura de tecido vegetal podem induzir uma variedade de respostas de estresse. Muitos estudos levaram a hipótese de que marcas epigenéticas estão relacionados a mecanismos de mutagênese induzida por cultura de tecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações na metilação do DNA em diferentes acessos (plantas de diferentes localidades do Brasil) de *Lippia alba* micropropagadas comparadas com plantas aclimatadas. O DNA genômico foi digerido com um par de enzimas de restrição isoesquisoméricas, *HpaII* e *MspI*, com capacidade de reconhecer o sítio 5'-CCGG-3. Posteriormente, os fragmentos de DNA obtidos foram amplificados por PCR usando primers ISSR. Os dados obtidos foram utilizados para construir uma matriz de dissimilaridade com base nos coeficientes de Jaccard e Dice, utilizando o software GENES. Dois dendogramas foram construídos por um método de análise de grupo utilizando médias aritméticas (UPGMA). Nossos resultados mostraram que, em geral, as plantas in vitro e aclimatadas não foram agrupados de acordo com suas semelhanças filogenéticas, mas de acordo com seus padrões de metilação do DNA. Os maiores valores para o coeficientes de Jaccard e Dice foram obtidos entre os acessos que compartilham as mesmas mudanças na metilação do DNA. Dos 28 marcadores polimórficos, 14 mostraram polimorfismo de metilação de DNA, no entanto, comprovadamente, 7 desses marcadores apresentaram diferença de padrão quando comparamos plantas in vitro e aclimatadas, sugerindo um diferencial de padrão de metilação de DNA quando as plantas in vitro são transplantadas para o solo. Apesar do aparente baixo número de polimorfismos encontrados, consideramos que estes estejam relacionados com importantes diferenças de expressão gênica.

IDENTIFICAÇÃO COMPUTACIONAL DE MIRNAS NO TRANSCRIPTOMA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Demani, L.¹, Grativol, C.¹, Vicentini, R.², Hemerly, A.S.¹ e Ferreira, P.C.G.¹

¹*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,*

²*Laboratório de Bioinformática e Biologia de Sistemas, Centro de Biologia molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.*

Os genes possuem vários mecanismos regulatórios. Um deles é a regulação por microRNAs (miRNAs). Por serem conservados em plantas, muitos estudos tem sido realizados para identificar os miRNAs em diferentes espécies com interesse econômico. A identificação de miRNAs em cana-de-açúcar pode ajudar a compreender melhor os mecanismos moleculares de regulação gênica dessa cultura. Neste trabalho foram identificados precursores de miRNA conhecidos e candidatos no banco de dados de transcriptoma de dois genótipos de cana-de-açúcar (Chunee e SP70-1143) construído pelo nosso grupo. Esse transcriptoma foi mapeado com sequências gênicas de *Saccharum officinarum* e *Sorghum bicolor* disponíveis em bancos públicos. Os contigs não mapeados foram considerados como possíveis sequências não-codificantes. Neste grupo de sequências, foram identificados os miRNAs homólogos de plantas e os miRNAs candidatos utilizando o pipeline baseado em Perl-scripts do miRCheck (<http://web.wi.mit.edu/bartel/pub/software.html>). Foram identificados 128 precursores de miRNA já descritos. O miRNA169 se destacou porque todos os membros da família tinham precursor no transcriptoma. A origem dos precursores de miRNA se dá pela duplicação invertida de segmentos do DNA. A partir disso, procuramos por essas duplicações e identificamos 2218 possíveis miRNAs. Uma das características de miRNAs é a regulação específica do seu RNAm alvo. Por isso, a busca por alvos permite verificar se uma sequência candidata a miRNA é responsável por regular um gene específico. Essa confirmação foi feita com a ferramenta Plant target prediction tool (<http://srna-tools.cmp.uea.ac.uk>). Todas as sequências candidatas tiveram alvos identificados, sugerindo que essas sequências são miRNAs. A identificação de miRNAs pode servir como inicial para caracterização das vias regulatórias semelhantes entre genótipos híbridos de cana-de-açúcar. Mais análises serão realizadas para confirmar que esses miRNAs candidatos são miRNAs característicos de planta e para analisar a expressão diferencial desses precursores de miRNAs no transcriptoma.

CONCEPÇÕES RELACIONADAS À BIOTECNOLOGIA POR ESTUDANTES DO ENSINO SUPERIOR À DISTÂNCIA: UMA ABORDAGEM APRESENTADA ATRAVÉS DE MAPAS CONCEITUAIS

Aguiar, J.M.^{1,2,3}, Berçot, F.F.^{2,3}, Ferreira, C.S.^{2,3}, Garcia, A.B.^{2,3} e Lannes, D.¹

¹*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil,*

²*Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brasil,*

³*Fundação Centro de Ciências e Educação Superior a Distância do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

O presente trabalho teve como objetivo identificar os conhecimentos em biotecnologia de alunos inscritos na disciplina Tópicos em Biotecnologia (BIOTEC), oferecida no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas à Distância, pela Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF/ Consórcio CEDERJ. A modalidade de ensino é semipresencial, ou seja, além das atividades à distância, acontecem encontros presenciais. Foram utilizados mapas conceituais em dois momentos distintos. No primeiro encontro, no início da disciplina, foi oferecida uma explicação sobre mapas conceituais, antes de qualquer abordagem ter sido feita sobre biotecnologia. Foi então solicitado aos alunos que construíssem seus mapas. Ao final do semestre, após todo o conteúdo da disciplina ter sido apresentado, os alunos construíram, à distância, o segundo mapa. Alguns fatores relevantes devem ser enfatizados. BIOTEC tem como pré-requisitos as disciplinas: Genética Básica e Biologia Molecular. O conteúdo destas tem estreita relação com conceitos aplicados em biotecnologia. Além disso, existe a influência dos veículos midiáticos sobre o respectivo tema. Após a análise dos mapas, pôde-se perceber inicialmente que alguns conceitos como: produção de células-tronco e transgênicos eram relacionados à biotecnologia e às técnicas modernas de biologia molecular. Demais resultados demonstraram que alguns alunos possuíam uma visão ética e social limitada às informações apresentadas pela mídia em geral. Porém, os mapas finais, apresentaram um número maior de organização estrutural, conceitos e inter-relações incluindo o conhecimento de temas como: biotecnologia clássica, impacto e desequilíbrio ambiental, etc. Sendo assim, conclui-se que, mesmo após os alunos terem cursado disciplinas relacionadas à biotecnologia, somente após a disciplina BIOTEC foi possível observar a inter-relação entre os conteúdos destas e de outras disciplinas e a biotecnologia. Apesar de indícios de que a disciplina BIOTEC influenciou na percepção dos alunos sobre conceitos e interdisciplinaridade presente na biotecnologia, novos trabalhos são ainda necessários para corroborar e verificar outros pontos e perspectivas.

UTILIZAÇÃO DE ANIMAÇÕES COMPUTACIONAIS A PARTIR DE DINÂMICA MOLECULAR NA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA E NO ENSINO DE CIÊNCIA

Dias, Giselly S.¹, Pascutti, P.G.² e Foguel, D.¹

¹*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil,*

²*Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

Na atualidade, as tecnologias de informação e comunicação vêm causando grandes e valiosas transformações em todas as áreas de conhecimento. Diversas estratégias de aprendizagem de ensino, tais como animações em 3D, uso da Web participativa, vídeo aulas e jogos interativos têm se tornado cada vez mais necessárias como auxílio no ensino de ciência e na divulgação científica. No entanto, a utilização dessas estratégias ainda cresce de forma vagarosa, pois muitas instituições ainda utilizam métodos cartesianos em sala de aula. Desse modo, este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Modelagem e Dinâmica Molecular (LMDM/IBCCF), a fim de ajudar na quebra deste paradigma permitindo uma visão holística do aluno e contribuir na popularização da ciência. Temas como estrutura 3D de aminoácidos, de biomembranas, estrutura e enovelamento de proteínas, são abordados. A animação é uma ferramenta poderosa que possibilita a apresentação de ideias e conceitos complexos a uma audiência diversificada, de diferentes áreas e especialidades. Estando o espectador imerso nas ideias e implicações do conteúdo da animação, ele pode ter um maior nível de entendimento e retenção da informação. Diferente das ilustrações de livros, as animações permitem um olhar intuitivo sobre os movimentos moleculares, permitindo ao espectador presenciar como ocorrem os fenômenos biológicos. Desta forma a informação contida nos vídeos é transmitida de maneira eficiente e cientificamente acurada ao mesmo tempo em que entretem o aluno. Com atenção especial para a didática, a linguagem pretende ser acessível ao leigo, mas trazendo informações relevantes para alunos do ensino médio, graduandos e especialistas. O conteúdo gerado estará disponível para uso em salas de aula na página do LMDM. **Palavras-chave:** popularização da ciência, divulgação científica, animação molecular.