

Biologia Molecular 2007

Projeto de Pesquisa

**Estudo evolutivo do gene codificador da Mioglobina em gastrópodes  
límnicos (Pulmonata: Basommatophora)**

**GRUPO 5:**

**Daniel Coscarelli**

**Filipe Freitas Chaves**

**Gabriel Fráguas**

**Juan Macedo**

**Paula Laper**

**Rafael Campos**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Mioglobina de Invertebrados

As globinas evoluíram muitas vezes entre os filos de metazoários, e, entre os invertebrados, estas proteínas apresentam origens distintas e uma variabilidade muito maior, tanto na sua estrutura primária e quaternária, quanto nas propriedades funcionais (Dewilde *et al.*, 1998).

Entre as globinas, a Mioglobina é um pigmento respiratório que armazena o oxigênio intramuscularmente e é um importante caractere adaptativo para organismos que vivem em ambientes com pressão parcial de oxigênio relativamente baixa (Cutruzzolaa, 1996). O padrão de origem e evolução das mioglobinas dos diversos grupos de invertebrados é semelhante aos das outras globinas, e várias formas convergentes de proteínas são chamadas genericamente de mioglobinas (Dewilde *et al.*, 1998). A evolução convergente das mioglobinas está relacionada com sua propriedade adaptativa, que está sujeita a pressões evolutivas que selecionam proteínas capazes de armazenar o oxigênio.

No filo Mollusca, vários táxons apresentam mioglobina. Dewilde *et al.*, (1998) apresentou uma tabela sintetizando os moluscos estudados e acrescentando *Biomphalaria glabrata*. Esta tabela mostra a diversidade de animais já estudados que abrangem três classes do filo, Gastropoda, Bivalvia e Polyplacophora. Essas ordens não estão agrupadas em um táxon monofilético (Figura 1), o que sugere uma provável origem múltipla da mioglobina dentro do filo. Entretanto, as outras classes não foram estudadas.

## 1.2. A Mioglobina na Subclasse Pulmonata e na Ordem Basommatophora

Entre os Gastrópodes, a mioglobina já foi estudada em vários táxons (Tabela 1 e Figura 2), principalmente dentro do grupo Euthyneura, que compreende a subclasse Pulmonata e os gastrópodes opistobranquios, que são vários táxons basais em relação a pulmonata agrupados informalmente (antiga Subclasse Opisthobranchia). Todos os opistobrânquios e alguns Pulmonata são marinhos, mas a maioria dos gastrópodes pulmonados é terrestre e a ordem Basommatophora (dentro de Pulmonata) é categoricamente de água doce.

A ordem Basommatophora é bastante estudada pela sua importância parasitológica, devido às diversas interações com trematódeos, incluindo *Schistosoma mansoni*, *S. hematobium* e *Fasciola hepática*, que têm como hospedeiros intermediários gastrópodes dos gêneros *Biomphalaria* (Planorbidae), *Bulinus* (Planorbidae) e *Lymnaea* (Lymneidae) respectivamente, todos da ordem Basommatophora. Entretanto, a sistemática da ordem é controversa, e vários

TABLE I  
Summary of molluscan Mb characteristics as described by Kapp et al. (5)

Species	Phylogenetic classification	Tissue of origin	Aggregation state (native molecule)	Sequence peculiarities	Similarity <sup>a</sup>	
					<i>A. limacina</i>	<i>L. pectinata</i>
<i>A. limacina</i>	Gastropoda, Opisthobranchia	Radular muscle	Monomeric	E7-V, B10-L, E10-R, A14-P, N-ac <sup>b</sup>	100.0	26.2
<i>A. juliana</i>	Gastropoda, Opisthobranchia	Radular muscle	Monomeric	E7-V, B10-L, E10-R, A14-P, N-ac	78.5	22.1
<i>A. kurodai</i>	Gastropoda, Opisthobranchia	Radular muscle	Monomeric	E7-V, B10-L, E10-R, A14-P, N-ac	86.8	23.7
<i>D. auricularia</i>	Gastropoda, Opisthobranchia	Triturative stomach	Monomeric	E7-V, B10-L, E10-R, A14-P, N-ac	79.4	22.7
<i>B. leachii</i>	Gastropoda, Opisthobranchia	Triturative stomach	Monomeric	E7-V, B10-L, E10-R, A14-P, N-ac	84.9	25.5
<i>C. rhizophorarum</i>	Gastropoda, Prosobranchia	Radular muscle	Dimeric	E7-H, B10-F, N-ac	23.4	25.7
<i>B. undatum</i>	Gastropoda, Prosobranchia	Radular muscle	Dimeric	E7-H, B10-F, N-ac	19.8	24.8
<i>B. canaliculatum</i>	Gastropoda, Prosobranchia	Radular muscle	Dimeric	E7-H, B10-F, N-ac	19.7	23.2
<i>N. mutabilis</i>	Gastropoda, Prosobranchia	Radular muscle	Dimeric	E7-H, B10-F, N-ac	24.6	23.9
<i>L. pectinata</i> I	Bivalvia, Heterodonta	Gill	Monomeric	E7-H, B10-F, N-ac	26.2	100.0
<i>L. pectinata</i> II	Bivalvia, Heterodonta	Gill	Self-aggregation	E7-Q, B10-Y, N-ac	22.4	32.1
<i>L. pectinata</i> III	Bivalvia, Heterodonta	Gill	Self-aggregation	E7-H, B10-Y, N-ac	19.6	30.0
<i>Acanthopleura japonica</i>	Polyplacophora	Gill	Monomeric	E7-H, B10-F, N-ac	25.2	16.3
<i>B. glabrata</i>	Gastropoda, Pulmonata	Radular muscle	Monomeric	E7-Q, B10-V (N-ac)	23.6	20.0

<sup>a</sup> Similarity of molluscan globin sequences calculated related to *A. limacina* and *L. pectinata* I.

<sup>b</sup> N-ac, N-acetylated.

Tabela 1: Síntese dos estudos de Mioglobina dentro do Filo Mollusca (Dewilde et al., 1998)

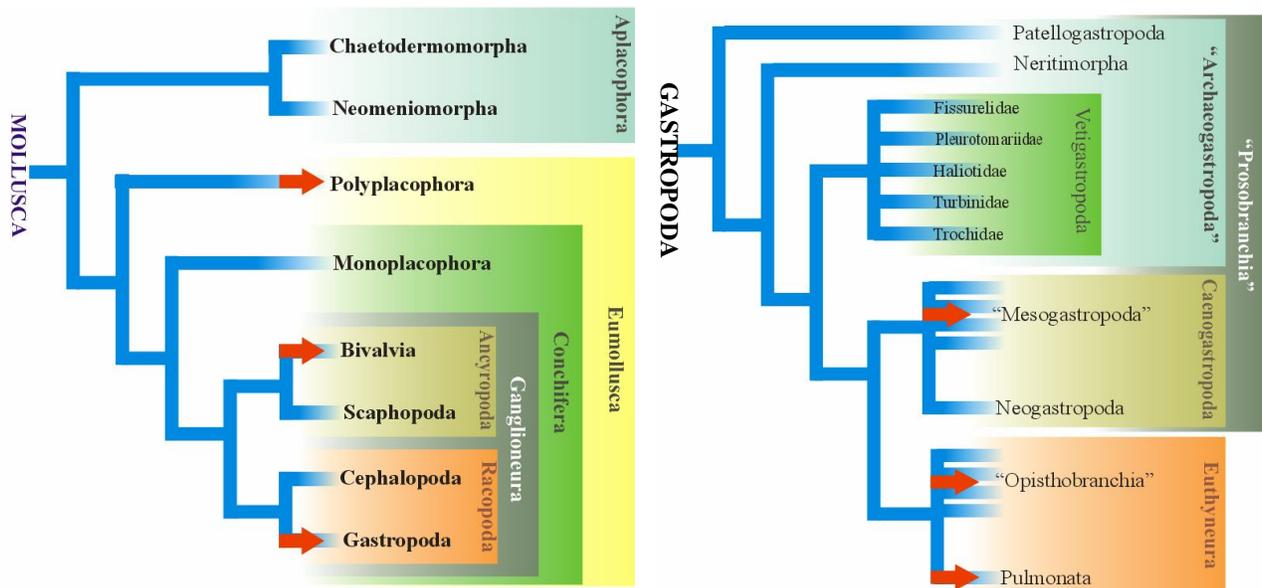


Figura 1: Esquema representando a filogenia do Filo Mollusca e da Classe Gastropoda segundo a sistemática clássica (Barnes, 2003). As setas vermelhas indicam os grupos em que a Mioglobina já foi estudada (Dewilde et al., 1998).

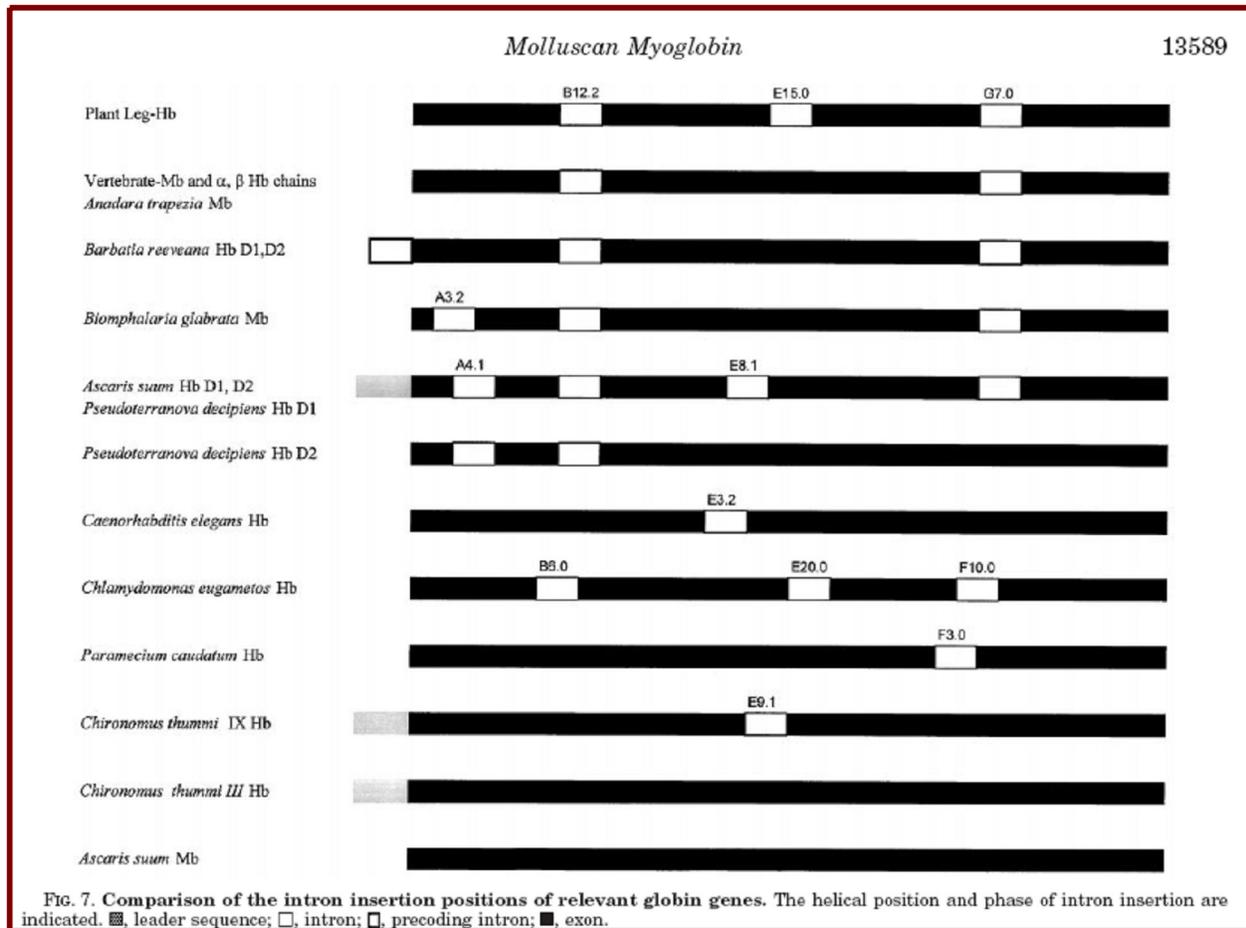
estudos apresentam resultados que apontam para uma possível polifilia (Grande *et al.*, 2002) ou parafilia (Dayrat & Tillier, 2002) da ordem, ou das famílias dentro da ordem (Morgan *et al.* 2002; Jorgensen *et al.*, 2004).

A árvore gerada pela análise cladística usando caracteres morfológicos feita por Dayrat & Tillier (2002), coloca a ordem Basommatophora como um grupo parafilético de gastrópodes basais a Geophila, que compreende os gastrópodes pulmonados verdadeiramente terrestres. Esse resultado é interessante pois coloca a origem de Pulmonata no ambiente marinho (Archaeopulmonata), passando primeiramente para o ambiente de água doce (Basomatophora) e num terceiro momento colonizando o ambiente terrestre (Geophila), o que contradiz a bibliografia anterior (Barnes, 1996; Brusca&Brusca, 2000), que coloca a origem de pulmonata no ambiente terrestre, passando para o ambiente marinho (Archeopulmonata) e de água-doce (Basommatophora) em momentos secundários diferentes na evolução dos pulmonados. A mioglobina se relaciona com a evolução dos pulmonatas devido à essas trocas de ambientes que ocorreram no processo evolutivo do grupo, pois o ambiente de água-doce é extremamente instável, devido a grande susceptibilidade a processos de eutrofização, estiagem, turbidez e variações sazonais, que alteram a taxa de oxigenação da água, que funcionaria como uma pressão evolutiva para a presença da mioglobina como resposta adaptativa a essas variações. Além disso, o padrão de evolução da mioglobina pode ser usado com um forte argumento para elucidar as questões relacionadas com a evolução dos pulmonata apresentadas por Dayrat & Tillier (2002). Apesar de toda a importância funcional da proteína mencionada acima, a seqüência de aminoácidos da proteína não é uma fonte conclusiva para retratar o padrão de evolução da proteína pois não evidencia as mutações silenciosas e a presença de introns, portanto o gene codificador é uma ferramenta mais completa para o estudo evolutivo da proteína do que ela mesma.

### **1.3. O gene da Mioglobina em gastrópodes pulmonados**

O único estudo já publicado sobre mioglobina de gastrópodes pulmonados foi feito por Dewilde *et al.* (1998), usando como modelo o gastrópode *Biomphalaria glabrata*, o principal hospedeiro intermediário do *S. mansoni*. Este trabalho se concentrou tanto nos aspectos estruturais e funcionais da proteína quanto no seu gene codificador e cDNA. A seqüência completa do gene codificador da mioglobina de *B. glabrata* foi depositada no GenBank com o número de acesso U89283, e pode ser usada como modelo para elaboração de primers para amplificação do gene e do cDNA de organismos filogeneticamente próximos a *B. glabrata*. Dewilde *et al.* (1998) também evidenciou a variação na posição e no número de introns dentro

da seqüência do gene da Mioglobina em gastrópodes e outros organismos (Figura 2). A posição relativa pos íntros pode ser um ferramenta adicional para estabelecer relações entre táxons, entretanto, nenhum estudo com esse objetivo foi feito.



**Figura 2:** Posição relativa dos introns de diferentes organismos (Dewilde *et al.*, 1998)

Portanto, a seqüência e as informações geradas por Dewilde *et al.* (1998) podem ser utilizadas como base para a elaboração de primers e sequenciamento do gene da mioglobina de outros gastrópodes. Como *B. glabrata* é classificado como um Pulmonata Basommatophora, e os basomatóforos são o grupo que apresentam uma pressão evolutiva para a presença de mioglobina mais acentuada (ambiente de água-doce), o estudo sobre a evolução do gene da mioglobina neste grupo de organismos é viável e significativo para elucidar as questões evolutivas de Pulmonata em geral.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Analisar a evolução do gene codificador da Mioglobina nos gastrópodes basomatóforos através da comparação de seqüências de nucleotídeos e posicionamento dos Introns.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Sequenciar o cDNA da Mioglobina dos táxons representativos das famílias de Basommatophora

Sequenciar o gene completo da Mioglobina dos táxons representativos das famílias de Basommatophora usando a seqüência da cDNA para elaboração de primers específicos que amplifiquem seqüências parciais do gene com tamanho viável para amplificação por PCR e sequenciamento.

Comparar as posições dos diferentes Íntrons e a seqüência dos Íntrons homólogos.

Avaliar a possibilidade do uso de seqüências do gene da mioglobina (Introns e Exons) como marcadores moleculares para filogenia molecular dos gastrópodes pulmonados.

Criar um Banco de cDNAs clonados de vários táxons de Basommatophora para futuras análises estruturais e funcionais da mioglobina.

### **3. JUSTIFICATIVA**

O estudo comparativo do gene da Mioglobina é uma importante fonte para obtenção de resultados conclusivos sobre a origem (mono/polifilética) da mioglobina entre os gastropodes pulmonados, o que pode ser usado como argumento para elucidar as questões pendentes sobre a sistemática e evolução de um grupo de organismos que apresentam uma importância parasitologia e médica muito relevantes para a medina tropical.

Além disso, este gene tem um grande potencial para ser utilizado como marcador molecular para a sistemática do grupo, pois apresenta introns em diferentes posições entre seqüências de exons que são mantidas conservadas pelo forte valor adaptativo conferido pela mioglobina a organismos dulcícolas. Entretanto, esse valor adaptativo pode ser a causa de convergências evolutivas que complicam muito a sistemática do grupo, e a avaliação da homologia entre genes de diferentes organismos é importante estabelecer a viabilidade do uso desse gene como marcador molecular.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostragem

Os animais amostrados para análise estão listados na tabela 2. Esses animais foram escolhidos devido ao seu valor significativo dentro das varias famílias do grupo e pela viabilidade de obtenção e coleta de material. Os animais devem ser obtidos ainda vivos para a extração de RNA

<b>Pulmonata: Basommatophora</b>	
Planorbidae	<i>Biomphalaria tenagophila</i>
	<i>Biomphalaria oligoza</i>
	<i>Helisoma duryi</i>
	<i>Drepatotrema cimex</i>
	<i>Drepanotrema anatum</i>
	<i>Acrorbis petricola</i>
Lymnaeidae:	<i>Lymnaea columella</i>
	<i>Lymnaea viatrix</i>
Physidae:	<i>Physa acuta</i>
	<i>Aplexa marmorata</i>
Ancylidae:	<i>Gundlachia lutzi</i>
	<i>Anisancylus dutrae</i>
	<i>Barnupia ingae</i>
	<i>Ferrisia gentilis</i>
Siphonariidae:	<i>Siphonaria hispida</i>
<b>Pulmonata: Archaeopulmonata</b>	
Helobiidae	<i>Melampus coffeus</i>
<b>Pulmonata: Stylommatophora</b>	
Veronicellidae:	<i>Sarasinula marginata</i>
Onchiidae:	<i>Onchidella celtica</i>
<b>Pulmonata: Systelomatophora</b>	
Succineidae:	<i>Omalonyx unguis</i>
Limacidae:	<i>Limax flavus</i>
<b>Prosobranchia: Caenogastropoda</b>	
Ampulariidae:	<i>Pomacea glauca</i>
<b>Opisthobranchia: Anaspidea</b>	
Aplysiidae:	<i>Aplysia juliana</i>

**Tabela 2:** Lista dos animais amostrados

### 4.2. Extração e quantificação de RNA

Os animais vivos serão mortos por esmagamento entre duas placas de petri de vidro limpas e autoclavadas. Uma parte do tecido muscular do pé será cortada e armazenada no ultrafreezer (-80°C) para posterior extração de DNA, o bulbo bucal será utilizado como substrato

de extração de RNA, devido às altas taxas de expressão de mioglobina que confere a essa estrutura um coloração vermelha. A extração do RNA total será feita pelo método RNazol (Anexo I)

O RNA extraído será dosado por espectrofotômetro (Anexo II)

### **4.3. RT-PCR e amplificação do cDNA da mioglobina**

O RNA total extraído no item 4.2 será utilizado em uma reação de RT-PCR para geração de cDNAs a partir do mRNAs extraídos, utilizando como iniciador o oligo dT. Como o tecido utilizado foi o bulbo bucal, o extrato será rico no mRNA de Mioglobina. (Anexo III)

O cDNA gerado pela RT-PCR será usado em uma reação de amplificação específica para cDNA de mioglobina utilizando como iniciadores o Oligo dT e o primer BIO1 descrito por Dewilde et al. (1998) Bio1: 5' TACTGTACACACAACCAGCCC 3'. (Anexo IV)

### **4.4. Clonagem do cDNA**

O fragmento amplificado no item anterior, correspondente ao cDNA da mioglobina será clonado no vetor T-easy P-gem (PROMEGA) segundo o protocolo do fabricante. O plasmídios serão utilizados na transformação de bactérias competentes (*E.coli* Top10) previamente preparadas com CaCl para permeabilização da membrana. A transformação será feita por choque térmico. As Bactérias transformadas serão plaqueadas em meio LB sólido com Ampicilina (10mg/mL) (Anexo V). A seleção dos clones positivos será feita por PCR de colônia utilizando os primers PucM13 fow/rev, que se anelam no vetor de clonagem e amplificam a região do plasmídio de inserção do cDNA. Os clones positivos serão transferidos para 5mL de meio LB líquido com Ampicilina (10mg/mL) e crescidos overnight a 37°C com agitação. Os 5mL de meio com as bactérias positivas serão utilizados na extração do DNA plasmidial com o kit Wizard Plus SV Miniprep (PROMEGA) (Anexo VI) segundo protocolo do fabricante. Este protocolo utiliza apenas 3mL de meio com bactérias, do restante ( $\pm 2$ mL) 600 $\mu$ L serão misturados com um volume igual de Glicerol e armazenados no ultrafreezer (-80°C) para montagem do banco de cDNA de mioglobina.

### **4.5. Sequenciamento do cDNA**

O DNA plasmidial será quantificado por eletroforese em gel de agarose e utilizado na reação de seqüência com o DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (AmershamBioscience) e com os primers PucM13 do vetor de clonagem. A reação será precipitada e a leitura da seqüência será feita pelo Sequenciador Automatico ABI.

#### **4.6. Extração de DNA**

A extração do DNA genômico será feita segundo o protocolo descrito por Sokolov, 2000. O método é específico para tecido de moluscos ricos em mucopolissacarídeos que inibem a reação de PCR (Anexo VII).

#### **4.7. Amplificação do Gene da Mioglobina por PCR**

O gene da mioglobina será amplificado em partes devido ao seu tamanho estimado a partir o gene de *B. glabrata*. Primers serão desenhados com base na sequência de *B. glabrata* e na sequência do cDNA de cada exemplar, o que permite a correção de alguma mutação silenciosa e permite um anelamento específico para táxons ainda não estudados. Estes primers também serão desenhados para amplificar fragmentos parciais que tenham uma região de sobreposição para viabilizar o alinhamento das sequências e geração de um consenso do gene completo.

Estes primers serão utilizados em uma reação de PCR com o DNA extraído (item 4.6), dNTPs, TAQ DNAPolimerase (Phoneuria) e Tampão especial 10x (Phoneutria) já contendo MgCl<sub>2</sub>, com um volume final de 10µL. O programa de amplificação consiste de uma desnaturação inicial de 95°C por 5 min, 29 ciclos com desnaturação a 95°C por 45 seg, Anelamento por 1 min, extensão a 72°C por 1min e 30seg, e uma extensão final a 72°C por 7min. A temperatura de anelamento dependerá do par de primers utilizados, e será calculada pela quantidade de bases A e T multiplicado por 2 somado a quantidade de bases C e G multiplicado por 4, com a padronização a ser estabelecida na prática.

#### **4.8. Sequenciamento do Gene da Mioglobina**

O produto gerado pela PCR do item 4.7 será visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Os produtos amplificados com sucesso serão purificados com o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA). O produto purificado será quantificado por eletroforese em gel de agarose e utilizado na reação de sequência no mesmo processo descrito para sequenciamento do cDNA (item 4.5), porém os primers utilizados na reação de sequência serão os mesmos utilizados na PCR que gerou o fragmento a ser sequenciado.

#### **4.9. Análise de Sequências**

Tanto as sequências de cDNA quanto as do gene da mioglobina serão analisadas com os mesmos softwares. Primeiramente, o cromatograma será usado para gerar o arquivo FASTA

pelo Sequence Scanner v.1, disponível online. Este arquivo será subido ao Blastn (NCBI) GenBank para certificação da especificidade da seqüência obtida. O alinhamento das seqüências parciais geradas (forward e reverse) e o alinhamento dos fragmentos do gene da mioglobina obtidos por ampliações separadas serão feitos no MEGA 4, juntamente com a edição manual e alinhamento geral das seqüências obtidas. Arvores filogenéticas poderão ser geradas a partir da seqüência completa o gene ou do introns separadamente para avaliar o seu potencial como marcador molecular para sistemática pelo PAUP 4.0 10 win.

## 5. CRONOGRAMA

### Ano 1:

	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11	m12
Amostragem	X	X	X									
Ext./Clon cDNA			X	X	X	X	X	X				
Seq cDNA					X	X	X	X	X			
Análise de Seq					X	X	X	X	X	X	X	X
Elab. Primers					X	X	X	X	X	X	X	X
Extração DNA			X	X	X	X	X	X	X	X		
Amplificação Int											X	X

### Ano2:

	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9	m10	m11	m12
Amplificação Int	X	X	X	X	X	X	X	X				
Seq Introns	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Análise de Seq		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Síntese Result.										X	X	X

## 6. ORÇAMENTO

### 6.1. Material de Consumo (Plásticos)

PRODUTO	Unid.	Quant.	Pç Unit	Pç Final
Ponteiras 10µL	Pcte 1000	5	30,00	150,00
Ponteiras 200µL	Pcte 1000	3	20,00	60,00
Ponteiras 1000µL	Pcte 1000	3	28,00	84,00
Ependorffs 200µL	Pcte 1000	3	68,00	408,00
Ependorffs 500µL	Pcte 1000	3	29,00	87,00
Ependorffs 1500µL	Pcte 1000	3	24,00	72,00
Falcon 50mL	Pcte 50	15	26,00	390,00
Plc. Petri	Pcte 12	50	10,00	500,00

TOTAL: 1.751,00

## 6.2. Material de Consumo (Kits e reagentes)

<b>PRODUTO</b>	<b>Unid.</b>	<b>Quant.</b>	<b>Pç Unit</b>	<b>Pç Final</b>
Kit t-easy pGEM	50 reações	2	670,00	1.340,00
Kit RT-PCR	100 reações	2	800,00	1.600,00
DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit	1000 tmp.	1	8.098,00	8.098,00
Seq. (Outros custos)	---	---	2.000,00	2.000,00
Kit PCR Clean-up	50 reações	4	350,00	1.400,00
Fnl/Clorf/AlIso 25:24:1	100mL	1	100,00	100,00
Isopropanol P.A.	1L	2	15,00	30,00
Etanol P.A.	1L	2	15,00	30,00
Extrato de Levedura	500g	1	50,00	50,00
Agar bacteriológico	500g	1	40,00	40,00
Peptona	500g	1	60,00	60,00
Ampicilina	1mL	10	10,00	100,00
Agarose	100g	1	130,00	130,00
Acrilamida	100g	1	400,00	400,00
ETDA	1L	4	50,00	200,00
Padrão de Peso Mol	1mL	5	100,00	500,00
TA - eletroforese	1mL	5	60,00	300,00
Brometo de Etídio	1mL	3	60,00	180,00
dNTPs Set ATCG	1mL	3	300,00	900,00
Taq DNApol	500unid	10	130,00	1.300,00
Tampão PCR 10x	1mL	10	40,00	400,00
Primers 25nM	1pb	300	02,50	750,00
Agarose	100g	1	130,00	130,00
Trizol	100mL	1	400,00	400,00
KCl P.A.	500g	1	70,00	70,00

TOTAL: 21.898,00

### 6.3. Material Permanente

<b>PRODUTO</b>	<b>Unid.</b>	<b>Quant.</b>	<b>Pç Unit</b>	<b>Pç Final</b>
Pipeta 0,1 – 2,0µL	Unid.	1	1.000,00	1.000,00
Pipeta 0,5 – 10,0µL	Unid.	1	890,00	890,00
Pipeta 20 – 100µL	Unid.	1	500,00	500,00
Pipeta 200 – 1000µL	Unid.	1	330,00	330,00
*Microcentrifuga	Unid.	1	5.000,00	5.000,00
*Termocicladora	Unid.	1	16.000,00	16.000,00
*Shaker (Estufa c/ agit.)	Unid.	1	2.500,00	2.500,00

\*Importação direta

TOTAL: 26.220,00

### 6.4. Orçamento Final

<b>Material de Consumo</b> Plásticos	1.751,00
<b>Material de Consumo</b> Kits e Reagentes 1	21.898,00
<b>Material Pemanente</b>	26.220,00

TOTAL: 49.869,00

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNDT, H.L., NASCIMENTO, D.G., XAVIER, L.P., SANTORO, M.M. 1998. *The Myoglobin and the Hemoglobin of Biomphalaria glabrata, an Evidence of Gene Duplication*. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz** **93**: 171-172.

BRUSCA, R. C. & BRUSCA, G. J. 2003. *Invertebrates*. Sunderland: Sinauer Associates. 2.ed. 936pp.

CUTRUZZOLAA F.; TRAVAGLINI ALLOCATELLI C.; BRANCACCIO A.; & BRUNOR M. 1996. *Aplysia limacina myoglobin cDNA cloning : an alternative mechanism of oxygen stabilization as studied by active-site mutagenesis*. **Biochem. J.** **314**: 83-90

DEWILDE, S.; WINNEPENINCKX, B.; ARNDT, M. H. L.; NASCIMENTO, D. G.; SANTORO, M. M.; KNIGHTI, M.; MILLERI, A. N.; KERLAVAGE, A. R.; GEOGHAGEN, N.; MARCK, E. V.; LIU, L. X.; WEBER, R. E.; MOENS, L. 1998. *Characterization of the Myoglobin and Its Coding Gene of the Mollusc Biomphalaria glabrata*. **The Journal of Biological Chemistry** **273 (22)**: 13583–13592.

DAYRAT, B. & TILLIER, S. 2002. *Evolutionary relationships of Euthyneuran gastropods (Mollusca): a cladistic re-evaluation of morphological characters*. **Zoological Journal of the Linnean Society** **135**: 403–470.

GRANDE, C.; TEMPLADO, J.; CERVERA, J. L. & ZARDOYA, R. 2004. *Molecular Phylogeny of Euthyneura (Mollusca: Gastropoda)*. **Molecular Biology Evolution** **21(2)**:303–313.

JORGENSEN, A.; KRISTENSEN, T. K. & J. R. STOTHARD. 2004. *An investigation of the “Ancyloplanorbidae” (Gastropoda, Pulmonata, Hygrophila): preliminary evidence from DNA sequence data*. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **32**: 778–787

MORGAN, J. A. T.; DEJONG, R. J.; JUNG, Y.; KHALLAAYOUNE, K.; KOCK, S.; MKOJI, G. M.; & LOKERA, E. S. 2002. *A phylogeny of planorbid snails, with implications for the evolution of Schistosoma parasites*. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **25**: 477–488

RUPPERT, E. E. & BARNES, R. D. 1996. *Zoologia dos Invertebrados*. São Paulo: Roca. 6. ed. 1029pp.

RUPPERT, E. E. & BARNES, R. D. 2005. *Zoologia dos Invertebrados*. São Paulo: Roca. 7. ed. 1145pp.

**ANEXOS:  
PROTOCOLOS, REAGENTES E  
SOLUÇÕES**

## **ANEXO I: PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE RNA**

- 1- Retire uma pequena amostra do seu tecido e coloque 2-3x o volume de TRIZOL ou RNazol.
- 2- Triture completamente o tecido em TRIZOL ou RNazol utilizando um triturador (lave-o cuidadosamente em água, álcool e água entre uma amostra e outra).
- 3- Transfira a suspensão do tubo onde foi triturado para um microtubo novo.
- 4- Adicione 200  $\mu$ L de Clorofórmio de alta qualidade, misture bem ou passe rapidamente no vortex e deixe no gelo por 15 min.
- 5- Centrifugue a 12.000g por 15 min a 4° C.
- 6- Transfira o sobrenadante para um microtubo novo e adicione volume igual de isopropanol de altíssima qualidade.
- 7- Coloque no freezer por pelo menos 30 min ou deixe em geladeira overnight.
- 8- Nesse momento, uma discreta “nuvem” de ácido nucléico.. pode às vezes ser percebido. Centrifugue a 12.000g por 15 min a 4° C.
- 9- Nesse momento pode-se perceber um pellet translúcido, descarte o sobrenadante e adicione 1 mL de álcool 95%.
- 10- Passe no vortex para soltar o pellet, nesse momento um pellet branco, bem visível pode ser percebido.
- 11- Centrifugue a 12.000g por 15 min a 4° C.
- 12- Descarte o sobrenadante e emborque o microtubo numa superfície limpa, sobre um papel de filtro ou papel higiênico, por 3-5 min para secar o pellet. Não permita que o tempo se extrapole, pois quanto mais seco, mais difícil de se ressuspender o pellet.
- 13- Ressuspenda o pellet em 50-100  $\mu$ L de água de alta qualidade tratada com DEPC.
- 14- Estoque em nitrogênio líquido ou a -70° C.

OBS: Todo material PLÁSTICO de ser NOVO e autoclavado (microtubos e ponteiros)

As soluções devem ser da melhor qualidade possível.

**MANTER TODAS AS AMOSTRAS NO GELO O MAIOR TEMPO POSSÍVEL.**

## **ANEXO II: QUANTIFICAÇÃO DO mRNA**

- 1- Diluir o mRNA 1:100 a 1:500 em água de alta qualidade
- 2- Ler as amostras em espectrofotômetro usando cubetas de Quartzo ou placas de 96 poços de Quartzo, comprimento de onda de 260/280.
- 3- A quantificação deve ser feita multiplicando-se a leitura a 260 OD pela diluição e por 40.  
[mRNA, mg/mL]=OD260 x dil. x 40.

### ANEXO III : PREPARAÇÃO DE cDNA POR TRANSCRIPTASE REVERSA

1. DNTPs (mistura a 2,5 mM).....	1,25 $\mu$ L	⇒
2. Reverse Transcriptase Buffer.....	2,50 $\mu$ L	⇒
3. 0,1 M Dithiothreitol (DTT).....	1,00 $\mu$ L	⇒
4. Rnasin (inibidor de Rnase).....	0,25 $\mu$ L	⇒
5. Oligo dT <sub>15</sub> 1/10 - 7.5 $\rho$ Moles.....	1,00 $\mu$ L	⇒
6. Amostra de RNA (0,2 $\mu$ g/ $\mu$ L).....	5,00 $\mu$ L	

- Preparar master mix multiplicando-se pelo n<sup>o</sup> de amostras mais 10%
- Distribuir as amostras de RNA e acrescentar 6  $\mu$ L de mix em cada tubo
- Aquecer a mistura a 70°C por 5 min. e resfriá-la em gelo por 5 min.
- Adicionar 1,5  $\mu$ L de Transcriptase Reversa (12,5 U/reacção) – 25U/reacção
- Deixar a temperatura ambiente por 5 min.
- Incubar a 37°C por 1:00h, 90°C por 5 min. e gelo por 5 min.
- Diluir a reacção final por adição de 87,5  $\mu$ L de água e estocar a -20°C

## ANEXO IV: AMPLIFICAÇÃO DE cDNA POR PCR

1. DNTPs (2,5 mM).....0,80 µL ⇒
2. Taq. Buffer c/ MgCl<sub>2</sub> a 15mM.....1,00 µL ⇒
3. Primers (mistura 1:1 de sense e anti-sense a 10 ρM final)....0,50 µL ⇒
4. Taq. Polimerase.....0,05 µL ⇒
5. H<sub>2</sub>O.....6,65 µL ⇒
  
6. cDNA.....1,00 µL + 9 µL de mix
  
7. Acrescentar óleo mineral aprox 20uL
8. Centrifugar a 10.000 rpm por 40 segundos ou dar um spin

### Programa da máquina de PCR

1. Desnaturação 95°C por 3 min.
2. Desnaturação 94°C por 1 min.
3. Anelamento \_\_\_\_ °C por 1 min.
4. Extensão 72°C por 2 min.
5. Repetir passo 2 por \_\_\_\_ vezes
6. Extensão 72°C por 7 min.
7. Gelo
8. Fim

## ANEXO V: CLONAGEM DE DNA KIT T-easy P.Gem PROMEGA

### **Ligação:**

MIX(por amostra):

Tampão -----5µL

Vetor -----1µL

DNA ligase T4 ---- 1µL

Produto de PCR-----XµL (de 1 a 4µL)

Água-----4µL – X (Completar para 10µL)

Incubar na geladeira (4°C) overnight

### **TRANSFORMAÇÃO:**

50µL ----- Células competentes (*E. coli* Top10)

2µL ----- Produto Ligado

Incubar no gelo: 0°C -- 30min

42°C---30seg.

0°C -- 3min

Transferir produto transformado para tubo contendo 1mL de meio LB líquido sem ampicilina

Incubar a 37°C por 1 hora, com agitação  
Plaquaer em meio LB sólido com Ampicilina 10mg/mL  
Incubar a 37°C overnight

## **ANEXO VI: Miniprep com o Kit da Promega**

Wizard *Plus* SV Miniprep DNA Purification System

### **Primeira Etapa: Lise das Células**

1. Usar de 1 a 5mL de Meio LB com colônias positivas previamente crescidas overnight no shaker a 37°C para formar um pellet de bactérias, centrifugando 1x por 5min a 10.000rpm ou por 1min a 4.000rpm por mais de 1x (colocando mais meio sobre o pellet já formado). Descartar o sobrenadante por inversão do tubo e bater levemente a boca do tubo em um papel toalha limpo para remover o excesso de meio.

2. Adicionar 250µL da Solução para ressuspensão celular (Cell Resuspention Solution) e ressuspender totalmente o pellet vortexando ou homogeneizando com a pipeta. **É muito importante ressuspender totalmente as células.**

**ATENÇÃO:** Para evitar contaminação por DNA cromossômico não use o vortex após o passo 2. Misture apenas invertendo o tubo.

3. Adicione 250µL da solução de lise celular (Cell Lysis Solution) e misture invertendo o tubo 4 vezes (não use o vortex). Espere de 1 a 5 minutos até que se forme a suspensão de células.

**ATENÇÃO:** É muito importante que se observe a formação parcial da suspensão de células lisadas antes de adicionar a Protease alcalina (passo 4); entretanto, não espere mais de 5min.

4. Adicione 10µL da Solução de Protease Alcalina (Alkaline Protease Solution) e misture invertendo os tubos 4 vezes. Incube em temperatura ambiente por 5 minutos.

**ATENÇÃO:** A Protease Alcalina inativa endonucleases e outras proteínas liberadas no processo de lise das células bacterianas que podem prejudicar a qualidade do DNA plasmidial, mas se a incubação com a protease alcalina for longa demais podem haver danos no DNA. Portanto não estenda a incubação passo 4 por mais de 5min.

5. Adicione 350µL da Solução de Neutralização (Wizard *Plus* SV Neutralization Solution) e imediatamente homogeneíze invertendo os tubos 4 vezes (não use o vortex).

6. Centrifugue as bactérias lisadas na velocidade máxima (13.000rpm) por 10 minutos em temperatura ambiente.

### **Segunda Etapa: Purificação do DNA Plasmidial**

Preparação: Identifique com o número das amostras uma coluna, um tubo coletor e um tubo de 1,5mL novo autoclavado para cada amostra (**Obs. Este tubo não faz parte do kit e deve ser**

**identificado tanto na parede do tubo quanto na tampa).** Acople a coluna ao tubo coletor de número correspondente.

1. Transfira o produto lisado da primeira etapa (aproximadamente 850µL) para a coluna. Evite ressuspender e transferir o precipitado branco junto como sobrenadante.

**ATENÇÃO:** Se por acidente algum vestígio do precipitado branco for transferido para a coluna, transfira de volta para o tubo todo o conteúdo da coluna e centrifugue por mais 5 ou 10 minutos na velocidade máxima (13.000rpm). Transfira o sobrenadante para a mesma coluna utilizada inicialmente para essa amostra. Esse é o único caso em que a coluna pode ser reutilizada.

2. Centrifugue o sobrenadante na coluna por 1 minuto na velocidade máxima (13.000rpm) em temperatura ambiente. Retire a coluna do tubo e descarte o flowthrough (líquido que passou da coluna para o tubo coletor durante a centrifugação). Volte com a coluna para o mesmo tubo coletor.

3. Adicione 750µL da Solução de Lavagem (Column Wash Solution), previamente diluída em etanol 95%, na coluna.

4. Centrifugue por 1 minuto na velocidade máxima (13.000rpm) em temperatura ambiente. Retire a coluna do tubo e descarte o flowthrough. Volte com a coluna para o mesmo tubo coletor.

5. Repita o procedimento de lavagem com 250µL de solução de Lavagem (Column Wash Solution).

6. Centrifugue por 2 minutos na velocidade máxima (13.000rpm) em temperatura ambiente.

7. Descarte o Flowthrough e centrifugue novamente por mais 1 minuto na mesma velocidade para tirar qualquer etanol residual da coluna. Retire a coluna do tubo coletor e descarte o tubo coletor e seu conteúdo.

8. Transfira a coluna para o tubo de 1,5mL novo, autoclavado, já identificado. Remova a tampa do tubo antes de colocá-lo na centrífuga (Passo 9).

9. Para eluir o DNA plasmidial adicione 50µL de água sem nucleases (Nuclease-Free Water) a coluna. Centrifugue por 1 minuto na velocidade máxima (13.000rpm) em temperatura ambiente.

**Certifique-se que o tubo está sem tampa.**

10. Após eluir o DNA, retire a coluna do tubo e a descarte.

11. Tampe o tubo e guarde a -20°C.

**Obs.:** O DNA é estável em água pura se mantido a -20°C ou menos. DNA é estável a 4°C se for mantido em buffer TE. Para estocar o DNA em buffer TE, adicione 11µL de TE 10x aos 100µL de DNA eluído. **NÃO adicione TE se o DNA for ser usado para sequenciamento.**

## **ANEXO VII: EXTRAÇÃO DE DNA – Aplicado para Moluscos**

SOKOLOV, P. E. 2000. *An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissues*. **J. Moll. Stud.** **66**: 573-575

**Tamanho da amostra:** 50 – 70mg de tecido muscular do pé

Cortar em pedaços de 2 – 3mm de espessura.

Esmagar o tecido entre duas folhas de papel-alumínio limpo.

Adicionar o tecido esmagado a 1mL de tampão de lise (lysis buffer) em um tubo de 2mL.

Vortexar brevemente e incubar a 55°C até a digestão completa do tecido, o que demora entre 1 e 2 horas, dependendo do tamanho dos pedaços de tecido.

Adicionar 100µL de KCl saturado para limpar o lisado e homogeneizar por inversão dos tubos (sem vortex!).

Incubar a solução no gelo por 5 minutos.

Neste estágio, a maior parte dos polissacarídeos e algumas proteínas estão precipitados juntamente com o potássio dodecyl sulfato.

Centrifugar por 10 a 15 min na velocidade máxima.

Coletar o sobrenadante em um tubo limpo e extrair duas vezes com volume igual de uma mistura de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25/24/1).

Transferir o sobrenadante limpo para outro tubo e adicionar um volume igual de isopropanol.

Homogeneizar por inversão e incubar a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos.

Centrifugar por 20min a 15000xg.

Descartar o sobrenadante e lavar o pellet com etanol 70%.

Secar o pellet a vácuo e ressuspender em 100µL de TE.

Adicionar a solução de RNase A para obter a concentração final de 10µg/mL.

Incubar a 37°C por 30 a 60 minutos.

**Tampão de lise (Lysis buffer):** 50mM Tris-HCl, pH 7,5, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulphate (SDS) 0,2-0,4 mg/ml Proteinase K.

**Tampão TE:** 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA

## ANEXO VIII: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

- 1- Montar as placas e espaçadores, evitando desníveis.
- 2- Preparar o **GEL DE POLIACRILAMIDA 6%**:  
Pipetar em um tubo Falcon (usado) 10 mL de “sopa primitiva” para cada gel  
Acrescentar 125 µL de Persulfato de Amônio 10%  
10 µL de TEMED, homogeneizar.
- 3- Verter a solução preparada no suporte montado e colocar o pente.
- 4- Conferir se o gel está polimerizado, retirar o pente e lavar as canaletas.
- 5- Encaixar o suporte na cuba e colocar TBE1X novo na parte interna e TBE1X usado na parte externa.
- 6- Diluir as amostras com Tampão de amostra 2X, volume a volume. Evitar pipetar óleo.
- 7- Aplicar as amostras e o padrão. Evitar bolhas de ar. Tampar a cuba.
- 8- Correr à 60V até as amostras saírem das canaletas. Aumentar a voltagem para 110 V.
- 9- Preparar **SOLUÇÃO FIXADORA** e colocar numa cuba (Solução p/ 1 a 3 géis):  
10 mL de etanol P.A.  
500 µL de ácido acético P.A.  
Água milli-Q ou deionizada q.s.p. 150 mL
- 10- Retirar, com cuidado, o gel do suporte. Marcar se necessário.
- 11- Colocar na solução fixadora por 10 min. ou até 24 horas, agitando suavemente.
- 12- Preparar a **SOLUÇÃO CORANTE** (solução de Nitrato de Prata):  
0,20 g de nitrato de prata  
Água milli-Q ou deionizada q.s.p. 150 mL
- 13- Retirar a solução fixadora e reservá-la em um frasco.
- 14- Colocar a solução corante na cuba, evitando derramá-la diretamente sobre o gel. Agitar suavemente por 10 min.
- 15- Lavar rapidamente com água milli-Q e novamente c/ água milli-Q por 3 min.
- 16- Preparar a **SOLUÇÃO REVELADORA**:  
2 g de Hidróxido de sódio  
300 µL de Formaldeído  
Água milli-Q ou deionizada q.s.p. 150 mL
- 17- Descartar a água milli-Q e colocar a solução de reveladora na cuba. Agitar suavemente por 10 min., observando o aparecimento das bandas.
- 18- Desprezar a solução reveladora e colocar a fixadora previamente reservada.
- 19- Secar o gel em papel celofane. (Procedimento: molhar o papel celofane em água ou fixador, esticá-lo sobre uma placa de vidro, colocar o gel sobre o mesmo, sobrepor ao gel outra folha de papel celofane molhada, dobrar as beiradas do celofane e deixá-lo secar de um dia para o outro).

## ANEXO VIII: SOLUÇÕES

### SOPA PRIMITIVA (Acrilamida a 6%)

- 1- 58 g de acrilamida
- 2- 2 g de bis-acrilamida
- 3- Água q.s.p. 200 mL
- 4- Homogeneizar os solutos
- 5- TBE 5x 200 mL
- 6- Água q.s.p. 1000 mL

### TBE 5x

- 1- 121,1 g de Tris Base
- 2- 51,3 g de ácido bórico
- 3- 3,72 g de EDTA
- 4- Completar com água para 2000 mL
- 5- Homogeneizar

### RNAzol

Preparar primeiro a solução desnaturante (D):

- 1- Dissolver 47,26 g de Isotiocianato de guanidina em 50 mL de água deionizada autoclavada
- 2- 2,5 mL de Citrato de Sódio (1M) pH=7,0
- 3- 5 mL de sarcosyl a 10%
- 4- 10 mL de acetato de sódio (2M) pH=4
- 5- Água q.s.p. 100 mL
- 6- Filtrar a solução. **NÃO AUTOCLAVAR.**
- 7- Guardar a 4°C ao abrigo da luz

RNAzol=Solução D + Fenol saturado com água (1:1)

### ACETATO DE SÓDIO (2M) pH=4,0

- 1- 11 g de Acetato de sódio
- 2- Adicionar o mínimo de água para dissolver o pó (10-20 mL)
- 3- Ajustar o pH para 4,0 com Ácido acético glacial
- 4- Completar o volume com água para 40 mL
- 5- Autoclavar a solução

### CITRATO DE SÓDIO (1M) pH=7,0

- 1- Dissolver 29,41 g de Citrato de Sódio em 80 mL de água
- 2- Ajustar o pH
- 3- Completar o volume para 100 mL
- 4- Autoclavar a solução
- 5- Estocar a 4°C

### SARCOSYL 10%

- 1- Dissolver 10 g de sarcosyl em 80 mL de água
- 2- Completar o volume para 100 mL
- 3- Autoclavar
- 4- Estocar a 4 °C

Meio de cultura LB Líquido

Peptona ----- 4,0g

Extrato de levedura---- 2,0g

NaCl ----- 4,0g

Água destilada ----- Completar para 400mL de Solução final

AUTOCLAVAR

Meio de cultura LB Sólido

Peptona ----- 4,0g

Extrato de levedura---- 2,0g

NaCl ----- 4,0g

Agar bacteriológico --- 6,0g

Água destilada ----- Completar para 400mL de Solução final

AUTOCLAVAR

**PARECERES SOBRE OS DEMAIS PROJETOS  
APRESENTADOS**

## GRUPO 1

Título: “Análise da influência da temperatura na expressão gênica do receptor CD11b em neutrófilos”

Autores: Bráulio Henrique Freire Lima, Diego Oliveira, Fábio Antônio Borges Vilgil, Paulo Augusto Bittencourt, Pedro Elias Marques Pereira Silva, Samuel Loureiro Gontijo

### 1. PROPOSTA

O projeto propõe verificar em qual etapa da expressão do receptor de membrana CD11b em neutrófilos há a regulação pela temperatura. Com isso, será analisado a influência da temperatura na taxa de transcrição do gene para CD11b e, assim, tentar correlacionar os dados obtidos com a função fisiológica da febre.

Situação atual:

A febre é relacionada a uma maior resposta a tumores e principalmente a um aumento da resposta imunológica, incluindo:

- Produção e Bioatividade de Citocinas
- Ativação e migração de neutrófilos e células dendríticas
- Proliferação de linfócitos
- Aumento da atividade citotóxica

A proteína CD11b possui papel importante na adesão dos neutrófilos ao endotélio dos vasos. Juntamente com o CD18, o CD11b forma um dímero que promove adesão dos neutrófilos assim como funciona como receptor para o fator de complemento 3 denominado C3b (CR3). Uma vez ativado, o receptor CR3 promove diversas funções do neutrófilo como a resposta oxidativa ou fagocitose. A expressão de CD11b na membrana é diminuída pelo aumento de temperatura e aumentada pela queda, mas somente uma vez que o neutrófilo já foi ativado por TNF- $\alpha$ .

### 2. AVALIAÇÃO CRÍTICA

#### 2.1. Pertinência

A febre pode ser definida como uma elevação, centralmente mediada, da temperatura corporal acima da variação diária normal, isto é, dos valores normais para um indivíduo, em resposta a um stress ou insulto. É apenas um componente da resposta febril, que consiste numa reação fisiológica complexa à doença envolvendo uma subida na temperatura interna mediada por citocinas, produção de reagentes da fase aguda e ativação de numerosos sistemas fisiológicos, endocrinológicos e imunológicos.

#### 2.2. Viabilidade

É surpreendente que, apesar da frequência clínica da febre, da sua ubiquidade no laboratório animal e dos dados indicando que faz parte dum mecanismo de defesa em vez duma resposta biológica incidental, na maioria das situações clínicas ainda não sabemos se tem um papel benéfico, prejudicial ou neutro. O valor da febre na preservação do hospedeiro durante episódios infecciosos continua a ser matéria de discussão, com dados inconciliáveis quanto ao valor da temperatura elevada. A maior parte dos estudos que se dedicam a esta questão foram

efetuados in vitro ou em animais e a sua aplicabilidade ao homem é pouco clara. Portanto, este projeto vem a auxiliar na compreensão maior sobre a fisiologia da febre.

## GRUPO 2

Título: “Análise Populacional e Evolutiva em Duas Espécies de *Acianthera* (Orchidaceae)”

Autores: André Miranda Cadete, Diego Soares Lara, Guilherme Gusmão Silva, Luiz Guilherme Zenóbio Alípio, Pedro Paulo Goulart Taucce

### 1. PROPOSTA

O projeto tem como objetivo comparar a homologia das seqüências de material genético da orquídea *Acianthera prolifera* ( presente em Minas Gerais, Bahia, Distrito Federal, Venezuela e Bolívia) com as da espécie *A. fornograndensis* ( presente no Espírito Santo), através da coleta de amostra de tecido foliar. Dessa forma, torna-se possível sinonimizar as espécies e traçar o caminho evolutivo das populações.

Situação atual:

- *A. prolifera* é encontrada em todo sudeste, exceto no Espírito Santo, além de Bahia, Distrito Federal, Venezuela, Bolívia e Guiana
- *A. fornograndensis* é encontrada apenas no Espírito Santo
- *A. prolifera* é rupícola, sendo encontrada, em MG, em campos rupestres.
- *A. fornograndensis* foi encontrada no interior de mata, porém também é rupícola, sendo que alguns exemplares foram encontrados sob sol forte
- Com o advento da Biologia Molecular a sistemática ganhou mais uma ferramenta
- Muitos taxonomistas vêm utilizando-a para corroborar dados morfológicos, ecológicos e biológicos
- Os marcadores plastidiais e ribossomais são muito utilizados em plantas para este fim, devido ao baixo nível de polimorfismo

### 2. AVALIAÇÃO CRÍTICA

#### 2.1. Pertinência

O sequenciamento das regiões propostas deverá resolver senão a sinonimização da *A. prolifera* em relação a *A. fornograndensis* como ao menos indicará relações evolutivas dentro do gênero.

#### 2.2. Viabilidade

O projeto terá duração de 1 ano e custo de aproximadamente R\$16.000,00. O tempo e o custo são razoáveis e o projeto tem um objetivo plausível, o que torna a pesquisa viável de ser feita.

## GRUPO 4

Título: “Utilização de marcadores moleculares na detecção do potencial de toxicidade e na análise filogeográfica de *Microcystis aeruginosa* (Lagoa da Pampulha – BH/MG)”

Autores: Ana Raquel Oliveira Santos, Débora Chaves Moraes, Iara Christina de Campos, Luciana Leite Fraga, Natália Lourenço Almeida, Raquel Maria Alves Cordeiro dos Santos

## 1. PROPOSTA

O projeto busca detectar cepas patogênicas da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* presentes na Lagoa da Pampulha (BH/MG) a partir da análise do gene *mcyB*, envolvido na síntese de peptídeos hepatotóxicos conhecidos como microcistinas; além disso pretende realizar uma análise filogeográfica das cepas de *M. aeruginosa* potencialmente tóxicas usando como marcadores moleculares o gene *mcyB* e a região intergênica (PC-IGS) do óperon da ficocianina (PC). Essa análise filogeográfica poderá determinar os tributários (afluentes) que apresentam as cepas tóxicas encontradas na Lagoa da Pampulha, favorecendo um adequado manejo ambiental.

## 2. AVALIAÇÃO CRÍTICA

### 2.1 Pertinência

As microcistinas sintetizadas por cepas de *M. aeruginosa* são um risco à saúde animal e são responsáveis por florações anuais que inviabilizam a sobrevivência de várias espécies na Lagoa da Pampulha. Dessa forma, a identificação das cepas tóxicas possibilitará o manejo adequado em eventuais florações; assim como a análise filogeográfica tornará possível a identificação e monitoramento dos tributários de origem dessas cepas. Favorecerá, também, a criação de iniciativas de educação ambiental.

### 2.2 Viabilidade

A análise dos marcadores moleculares *mcyB* e PC-IGS poderá determinar a toxicidade e filogenia das cepas de *M. aeruginosa*, assim facilitando a identificação dessas e adoção de programas de manejo do ambiente aquático. Porém, somente com o apoio e conscientização da sociedade um plano de manejo se tornará plenamente eficaz, haja visto que não se trata de um caso de importância médica.

## GRUPO 6

Título: “Comparação de isoformas presentes no veneno das espécies de *Loxosceles* de maior importância clínica no Brasil”

Autores: Ana Cláudia S. Raslan, Guilherme Henrique, Marcus Thadeu Santos, Marina L. Pucci, Rafael Lucas M. Guedes, Rafael R. Ferrari

## 1. PROPOSTA

O projeto visa comparar proteínas presentes no veneno de quatro espécies de *Loxosceles*, com destaque para as proteínas com atividade esfingomielinásicas – principal composto do veneno e responsáveis pela atividade dermonecrótica e letal do mesmo – para fins de estudo de sua capacidade imunogênica e posterior desenvolvimento de soros.

Situação atual:

- Atualmente, são conhecidos cDNAs para proteínas dermonecróticas em apenas uma das espécies principais causadoras de acidentes, a *L. intermedia*.
- O tratamento inespecífico consiste na administração de corticosteróides e pode ser necessária a excisão cirúrgica da lesão necrótica.
- O tratamento específico envolve produção de soros através da imunização de cavalos com o veneno bruto; exige a manutenção de grande quantidade de aranhas em cativeiro, além da exposição constante dos animais imunizados às substâncias tóxicas do veneno. Além disso, o soro não é muito eficiente contra a atividade letal e dermonecrótica.

## 2. AVALIAÇÃO CRÍTICA

### 2.1. Pertinência

Os acidentes com *Loxosceles* vêm se tornando um problema crescente de saúde pública, sendo a maioria dos casos ocorrida nas regiões Sul e Sudeste, em ambientes domiciliares. Vários fatores têm contribuído para o estabelecimento e crescimento de populações de *Loxosceles* nos ambientes urbanos; entre eles a ação antrópica que expulsou essas aranhas do seu ambiente natural (cavernas, frestas de rochas), trazendo-as para as regiões urbanizadas; a abundância de presas e a ausência de predadores naturais nos ambientes urbanos.

Essas aranhas são de grande importância médica, devido ao grande número de acidentes e ação dermonecrótica e hemolítica do veneno, expondo um grande risco para a população. Dessa forma, visto a pouca eficiência dos tratamentos atuais e importância médica do loxoscelismo, o estudo das proteínas presentes no veneno se faz necessário para o desenvolvimento de novos soros e tratamentos.

### 2.2. Viabilidade

A análise da homologia entre as proteínas do veneno das quatro espécies de *Loxosceles* estudadas e dos resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* das isoformas selecionadas poderá favorecer a produção de soros com proteínas recombinantes, mais eficientes que os atuais e contra as quatro espécies de maior importância médica no Brasil. Além disso, favorece a criação de um banco de dados com essas proteínas seqüenciadas que poderá servir a estudos posteriores.

## GRUPO 7

Título: “Silenciamento dos genes **ldh** e **ack** de *Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermosaccharolyticum* a fim de aumentar a eficiência de produção de etanol”

Autores: Bárbara Muniz, Clarissa Bastos, Érica Molfetti, Guilherme Augusto, Marcos Hanashiro, Mariana Pereira e Nara Pádua

### 1. PROPOSTA

O projeto visa a utilização de técnicas da biologia molecular para silenciar os genes de *Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermosaccharolyticum* que codificam as enzimas acetato cinase (**ack**) e lactato desidrogenase (**ldh**), com a finalidade de aumentar a quantidade de produtos utilizados na via de produção do etanol (feita por hidrólise enzimática da celulose por

essas bactérias) e assim melhorar a eficiência na produção do mesmo. As enzimas **ack** e **ldh** promovem reações que desviam os substratos da via do etanol para outras vias metabólicas.

Situação atual:

- O processo convencional de produção de etanol utiliza-se da hidrólise de açúcares, principalmente o amido.
- A hidrólise da celulose é uma nova abordagem que representará um melhor aproveitamento dos resíduos agrícolas, industriais e municipais.

## 2. ANÁLISE CRÍTICA

### 2.1 Pertinência

A necessidade de fontes renováveis de energia alternativas ao petróleo é uma realidade; e o etanol figura como uma boa opção devido ao fato de ser um combustível renovável, em contraposição ao petróleo, ter um custo relativamente menor e emitir menos poluentes, além de sua reconhecida eficiência como combustível. Uma nova abordagem no processo de produção do etanol poderá trazer mais vantagens, como uma menor dependência das importações de combustíveis, reduzindo déficits comerciais, a criação de empregos nas áreas rurais, o melhor aproveitamento dos resíduos agrícolas e maior preservação ambiental.

### 2.2 Viabilidade

O silenciamento dos genes **ack** e **ldh**, associados à enzimas de vias metabólicas paralelas à via de produção do etanol, e não essenciais ao metabolismo dessas bactérias, poderá otimizar o aproveitamento dos substratos para a produção do mesmo. Assim, a obtenção de bactérias *Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermosaccharolyticum* com esses genes silenciados representa uma boa alternativa para a produção de etanol.

## GRUPO 8

Título: “Análise do papel das proteínas do complexo Polycomb na proliferação de células de melanoma”

Autores: Gustavo Bastos, Hugo Rezende, Monica Maertenz, Paula Gonçalves, Rafael Ribeiro, Stella Maris

### 1. PROPOSTA

O grupo tem como objetivo analisar o papel das proteínas do complexo Polycomb na proliferação de melanócitos tumorais, pela utilização da técnica de RNAi. De uma forma geral, o grupo pretende comparar a expressão de genes do complexo Polycomb entre cultura de células de melanoma e melanócitos de epitélio normal através de ensaio de microarray, analisar por Western Blot a expressão das proteínas cujo mRNA apresentou super expressão no microarray, silenciar por RNAi os genes que estão super expressos no tecido tumoral comparado com os melanócitos normais e silenciar por RNAi os genes que estão super expressos no tecido tumoral comparado com os melanócitos normais.

Situação atual:

- O grupo de proteínas Polycomb (PcG) são repressores transcricionais que ajudam na manutenção da identidade celular durante o desenvolvimento dos metazoários por modificações hipergenéticas na estrutura da cromatina.
- A inexistência de informações recentes mais abrangentes e detalhadas sobre as neoplasias malignas de pele no Brasil, impossibilita que se trace o perfil real da magnitude do problema.

## 2. AVALIAÇÃO CRÍTICA

### 2.1. Pertinência

O câncer de pele do tipo melanoma tem tido cada vez mais freqüente em todo o mundo, sendo importante seu estudo. Acredita-se que o estudo das proteínas Polycomb (PcG) podem ajudar a descobrir as maiores causas e tratamento para a doença.

### 2.2. Viabilidade

O projeto tem duração média de 2 anos e custo aproximado de R\$70.000,00, mostrando-se viável a sua realização, levando em conta o valor científico das descobertas que podem ser feitas.