

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROJETO DE PESQUISA

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA DETECÇÃO DO
POTENCIAL DE TOXICIDADE E NA ANÁLISE FILOGENÉTICA DE
Microcystis aeruginosa (LAGOA DA PAMPULHA – BH/MG)**

Ana Raquel Oliveira Santos

Débora Chaves Moraes

Iara Christina de Campos

Luciana Leite Fraga

Natália Lourenço Almeida

Raquel Maria Alves Cordeiro dos Santos

Belo Horizonte

2007

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

OBJETIVO:

Esse projeto propõe o emprego de marcadores moleculares para a avaliação genética de cepas de *Microcystis aeruginosa* obtidas na Lagoa da Pampulha e em seus oito principais afluentes (Córregos Olhos D'água, AABB, Braúnas, Água funda, Tijuco, Mergulhão, Sarandi e Ressaca). Utilizando primers FAA (5'-CTATGTTATTTATACATCAGG-3'), RAA (5'-CTCAGCTTAACTTGATTATC-3') serão realizados PCRs com o material genético destas algas afim de avaliar a presença do gene *mcyB* nas cepas coletadas.

Caso seja diagnosticada a ocorrência de linhagens tóxicas de *Microcystis aeruginosa*, será realizada a análise filogenética de tais cepas, baseada na comparação das seqüências, dos produtos amplificados da PCR realizada com oligonucleotídeos iniciadores PCbF (59-GGCTGCTTGTTTACGCGACA-39), o primer direto, e PCaR (59-CCAGTACCACCAGCAACTAA-39), o primer reverso, específicos para o operon da ficocianina.

Este projeto visa responder as seguintes questões:

- 1) Existem cepas tóxicas de *Microcystis aeruginosa* na Lagoa da Pampulha e em seus tributários?
- 2) De qual(is) tributário(s) são provenientes as cepas encontradas na lagoa?

Considerando-se o grau de degradação e eutrofização da Lagoa da Pampulha e tributários, espera-se encontrar cepas tóxicas de *Microcystis aeruginosa* nesses ambientes.

A fim de testar esta hipótese serão realizados ensaios em laboratório com culturas de cepas provenientes da região de estudo.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

- i) Utilizando-se a técnica de PCR, e primers FAA e RAA (Neilan et al 1999), avaliar se ocorre a amplificação do gene *mcy B* em cianobactérias da espécie *Microcystis aeruginosa*;

- ii) Correlacionar a ocorrência das cepas tóxicas encontradas na lagoa com as cepas encontradas nos tributários. A partir desta análise filogeográfica será possível inferir o(s) tributário(s) de origem das cepas tóxicas, que as carregam para a lagoa.

REVISÃO LITERÁRIA:

O reservatório da Lagoa da Pampulha foi construído em 1938, e situa-se na parte norte do município de Belo Horizonte/MG. Uma grande parte de sua bacia de drenagem estende-se ainda até o Município de Contagem. Trata-se de um pequeno reservatório, com cerca de 2,4 quilômetros quadrados de espelho d'água, profundidade máxima ao redor de 16 metros e profundidade média em torno dos 5 metros. O volume de água acumulado era da ordem de 18 milhões de metros cúbicos mas foi gradualmente reduzido a cerca de 12 milhões devido a um intenso processo de assoreamento.

A importância deste reservatório, no entanto, não está em suas características morfométricas ou hidrológicas. A bacia do reservatório ainda abriga o que talvez seja a maior reserva de área verde e espaço de lazer da cidade. Grandes áreas verdes como o Jardim Zoológico, o campus da UFMG e diversos parques, praças e jardins situam-se nas suas imediações. Ao redor da lagoa, encontram-se ainda vários clubes de lazer e um dos maiores complexos desportivos do Brasil: os estádios do Mineirão e do Mineirinho e o Centro Desportivo Universitário.

Apesar de sua importância no contexto urbanístico de Belo Horizonte, a lagoa da Pampulha se encontra muito impactada, sofrendo basicamente três grandes problemas ambientais: o assoreamento, a contaminação, e a eutrofização.

O assoreamento vem sendo causado pelo aporte de sedimentos inorgânicos (areias, argilas e silte) gerados por processos erosivos que tomaram conta das encostas desmatadas para especulação imobiliária. Estes loteamentos estão situados próximo à desembocadura dos córregos Sarandi-Ressaca.

A contaminação seja ela por agentes patógenos (*Schistosoma mansoni*) seja ela por agentes ecotoxicológicos (metais pesados) já foi detectada na lagoa. Os agentes patógenos provêm de focos nos tributários, onde vivem populações em condições miseráveis e que muitas vezes estão em contato direto com os esgotos. Os metais pesados e outros agentes tóxicos são gerados nos efluentes de muitas indústrias, oficinas e grandes transportadoras e no chorume do aterro sanitário que são carregados para os tributários.

A eutrofização é caracterizada pelo aumento da biomassa de fitoplâncton e outras plantas aquáticas devido a um grande acúmulo de nutrientes inorgânicos, principalmente o fósforo, carregados para o lago pelos esgotos não tratados que são despejados em seus tributários, principalmente nos córregos Ressaca e Sarandi.¹

A diversidade de zooplâncton encontrada na Lagoa é muito pequena. Apenas cinco grupos foram encontrados, com dominância marcante dos copépodos cicloipoides, um grupo muito tolerante e freqüentemente encontrado em águas doces eutrofizadas. Importante notar também a presença de *Daphnia* sp. a partir de 2004. Embora em baixa abundância, pode indicar que a qualidade da água

encontra-se um pouco melhor que nos anos passados, uma vez que essas espécies não conseguem sobreviver em águas muito poluídas.

Em relação ao fitoplâncton, é importante evidenciar que os grupos encontrados com mais frequência foram as cianobactérias como, *Merismopedia* sp, *Microcystis* sp, *Anabaena* sp, e *Aphanizomenon* sp. As cianobactérias são também organismos muito tolerantes a águas poluídas e conseguem permanecer nesses ambientes ao contrário de outros grupos de fitoplâncton.

Algas da espécie *Microcystis aeruginosa*, objeto de estudo deste trabalho, foram consideradas dominantes na lagoa no período de 1989/90, quando ocorriam florações constantes (Freitas et al.,1992).

A forte dominância de copépodos ciclopoídes e das cianobactérias é uma indicação da baixa qualidade da água na lagoa da Pampulha. Além disso, espécies de cianobactérias como *Microcystis* sp, *Anabaena* sp, *Aphanizomenon* sp podem produzir toxinas, comprometendo a qualidade da água para consumo e lazer, além de inibir o estabelecimento de outros grupos de algas. Todas essas condições podem, em suma, apresentar sérios riscos saúde humana.¹

As toxinas de cianobactérias, que são conhecidas como cianotoxinas, constituem uma grande fonte de produtos naturais tóxicos produzidos por esses microorganismos e, embora ainda não estejam devidamente esclarecidas as causas da produção, têm-se assumido que esses compostos exerçam função protetora contra herbivoria, como acontece com alguns metabólitos de plantas vasculares (Campos, M. O., 2006). Algumas dessas toxinas são caracterizadas por sua ação rápida, causando morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição, e têm sido identificadas como alcalóides ou organofosforados neurotóxicos. Outras são identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos. Estes são os dois principais grupos de cianotoxinas neurotoxinas e hepatotoxinas.

Há três tipos de hepatotoxinas: cilindrospermopsinas, microcistinas e nodularinas, sendo que microcistinas e nodularinas são as hepatotoxinas produzidas por cianobactérias mais freqüentes em florações de água doce e salgada. As hepatotoxinas chegam aos hepatócitos por meio de receptores de ácidos biliares (Runnegar et al.,1981; Erikson et al.,1990; Falconer,1991) e promovem a desorganização dos filamentos intermediários e dos filamentos de actina, que são polímeros protéicos componentes do citoesqueleto (Runnegar & Falconer, 1986). Esta desorganização leva a uma retração dos hepatócitos, provocando a perda de contato entre eles com as células que formam os capilares sinusoidais. Como conseqüência, o fígado perde sua arquitetura e desenvolve graves lesões internas. A perda de contato entre as células cria espaços internos que são preenchidos pelo sangue que passa a fluir dos capilares para esses locais (Hooser et al., 1991; Carmichael, 1994; Matsuhima et al., 1990; Yoshizawa et al.,1990). Estudos referentes aos mecanismos de ação destas hepatotoxinas têm

demonstrado que várias microcistinas são potentes inibidores de proteínas fosfatases tipo 1 e 2A de células eucariontes (Honkanen et al., 1990). As hepatotoxinas são agora reconhecidas como potentes promotores de tumores hepáticos (Falconer, 1991; Fujiki, 1992; Nishiwaki-Matsuhima et al., 1992) e, portanto, a ocorrência de espécies potencialmente produtoras dessas substâncias nos ambientes aquáticos precisa ser investigada.

As intoxicações de populações humanas pelo consumo oral de água contaminada por cepas tóxicas de cianobactérias já foram descritas em países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul (Falconer, 1994). No Brasil, o trabalho de Teixeira et al. (1993) descreve uma forte evidência de correlação entre a ocorrência de florações de cianobactérias, no reservatório de Itaparica (Bahia) e a morte de 88 pessoas, entre as 200 intoxicadas, pelo consumo de água do reservatório, entre março e abril de 1988.

No início de 1996, 123 pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise em uma clínica da cidade de Caruaru (PE), passaram a apresentar um quadro clínico compatível com uma grave hepatotoxicose, que no entanto não era correlacionada com nenhum dos fatores usualmente tidos como causadores deste tipo de intoxicação. Destes, 54 vieram a falecer até cinco meses após o início dos sintomas e, de acordo com informações fornecidas pela Secretaria de Saúde de Estado de Pernambuco, a referida clínica recebia água sem um tratamento completo e usualmente era feita uma cloração no próprio caminhão tanque utilizado para transportar a água, em períodos de falha no abastecimento pela rede pública.

As análises feitas Profa. Sandra M.F.O.Azevedo na Universidade Federal do Rio de Janeiro- Rio de Janeiro- Brasil, e pelo Prof. Wayne W. Carmichael na Wright State University – Ohio – Estados Unidos, confirmaram a presença de microcistinas no carvão ativado utilizado no sistema de purificação de água da clínica, bem como em amostras de sangue e fígado dos pacientes intoxicados (Azevedo, 1996; Carmichael et al., 1996). Além disso, as contagens das amostras do fitoplâncton do reservatório que abastecia a cidade demonstraram uma dominância de gêneros de cianobactérias comumente relacionados com a produção de cianotoxinas.

A detecção de cianobactérias toxigênicas por meio de métodos moleculares somente foi possível recentemente, após a identificação e o sequenciamento dos genes envolvidos na biossíntese das toxinas (Christiansen et al., 2003 ; Schembri et al., 2001; Tillet et al., 2000; Wilson et al., 2000). Assim, oligonucleotídeos iniciadores podem ser desenhados tendo como alvo seqüências específicas desses genes, permitindo a amplificação por PCR e conseqüentemente a detecção das cianobactérias que os possuem (Lorenzi, A. S., 2004). Os genes envolvidos na produção de microcistina são denominados *mcy*. O gene *mcy* possui 10 ORFS (quadro aberto de leitura) *mcyA*-*mcyJ*. As estruturas dessas

cianotoxinas sugerem que o mecanismo de ação delas ocorre sem a participação ribossomal. (Kleinkauf, H. & Von, D, 1996). A síntese destas cianotoxinas ocorre através de uma série de reações catalisadas por enzimas multifuncionais chamadas de sintetase de peptídeos (PS) e sintetase de policetônicos (PKS) (Arment & Carmichael, 1995; Ditmann et al., 1997).

Técnicas de genética molecular fornecem uma estimativa do número de formas distintas de cianobactérias numa área, bem como medidas de quão diferentes elas são. Entre essas técnicas, as mais amplamente utilizadas têm sido as de medidas de diversidade genética, filogenia e filogeografia (Avisé, 2000).

Vários métodos moleculares usados para inferir relações filogenéticas dentro das cianobactérias foram revisados por Willmonte (1994). As cianobactérias possuem aparato fotossintético constituído por clorofila *a* e pigmentos acessórios específicos, incluindo alofocianina, **ficocianina** (PC), e ficoeritrina. Dentro do domínio *Bactéria*, os genes codificadores de PC são encontrados exclusivamente em cianobactérias. O operon PC possui uma região de espaço intergênico (IGS), entre os dois genes *cpcB* e *cpcA*, que é relativamente grande se comparada com outras existentes nos genes do pigmento fotossintético das cianobactérias, que apresente variações suficientes nas seqüências que permitem identificar diferentes linhagens de cianobactérias. Todas essas características do *cpcBA*-IGS propiciam uma maneira rápida e direta para detecção de cianobactérias, análise filogenética e avaliação da estrutura das comunidades de cianobactérias.

JUSTIFICATIVA:

O ambiente de estudo encontra-se sob grande influência antrópica e pesquisas corroboram a situação de degradação ambiental. A eutrofização artificial da lagoa da Pampulha contribui para a ocorrência freqüente de florações de cianobactérias, dentre elas destacando-se *Microcystis aeruginosa* como espécie dominante no ambiente. A determinação molecular da presença dos genes produtores de toxinas torna-se importante pois determinada cianobactéria pode possuir o potencial genético para a produção da toxina, mas devido a fatores ambientais, estas podem não estar sendo liberadas no momento da avaliação.

Uma possível liberação de cianotoxinas agravará ainda mais a situação já comprometida da lagoa. Tais toxinas são extremamente prejudiciais ao ambiente aquático sendo até mesmo deletérias para algumas espécies; os efeitos tóxicos causados em seres humanos são alarmantes. Apesar da visível degradação da Lagoa da Pampulha ainda são comuns as atividades de pesca e recreação, que expõem os indivíduos ao risco direto de uma contaminação.

É de fundamental importância o conhecimento de linhagens tóxicas de *Microcystis aeruginosa* que ocorrem na lagoa. Dessa forma será possível realizar o manejo adequado do ecossistema aquático em eventuais florações, bem como adotar medidas preventivas para que não venham a ocorrer.

Uma vez confirmada a existência de cepas tóxicas, faz-se necessária a realização de análises periódicas da água a fim de detectar a produção de cianotoxinas no ambiente.

Através da análise filogenética será possível identificar os tributários de origem das cepas tóxicas, e então monitorá-los para evitar o influxo das mesmas no ambiente lântico.

É de fundamental importância o fomento de iniciativas de educação ambiental. Com isso, o risco da ocorrência de acidentes envolvendo cianotoxinas pode ser minimizado.

MATERIAIS E METODOLOGIAS

1- Coletas:

Será realizada uma coleta em cada uma das seguintes regiões:

- a) corpo central da Lagoa da Pampulha;
- b) à jusante de cada um dos oito tributários.

No ato da coleta será realizado um arrasto vertical e um arrasto horizontal com rede de fitoplâncton (diâmetro de malha 25µm). As amostras obtidas serão acondicionadas sob refrigeração até o momento do isolamento das colônias.

2- Isolamento e condições de cultivo:

Colônias de *Microcystis aeruginosa* serão isoladas de acordo com a técnica de micropipetagem em microscópio invertido (Vieira, A.A.H. 1977). Serão obtidas trélicas de culturas para cada ponto,

As culturas são mantidas em erlenmeyers, numa câmara ambiente para germinação em temperatura de aproximadamente 25.0° C e fotoperíodo 12h claro/ 12h escuro. A intensidade de luz varia entre 86 – 30 µmol.s⁻¹.m⁻². O meio utilizado é WC (Guillard & Lorenzen 1972).

3-Extração de DNA

A extração de DNA genômico total será realizada a partir do método modificado de purificação de DNA de bactérias gram-negativas (Neilan, B. A., 1995). Primeiramente, 1 mL da cultura é precipitado por centrifugação, o sobrenadante é descartado e o precipitado é resuspendido em 500µL de 50 mM Tris- HCl (pH 8,0)- 5mM EDTA (pH 8,0)- 50mM NaCl). Acrescenta-se lisozima para uma concentração final de 1mg/mL e a solução é incubada a 55 °C por 30 minutos. Adiciona-se 10 µL de Proteinase K(10mg/mL) e 20 µL de SDS 10% e a mistura

incubada a 55 °C por 10 minutos. Coloca-se a solução no gelo para resfriá-la e extrai-se a solução com um volume igual de clorofórmio-fenol-álcool isoamil (25:24:1). Repete-se a extração e acrescenta-se um volume igual de acetato de amônio 4M ao sobrenadante. O DNA genômico total é precipitado através da adição de dois volumes de isopropanol e centrifugado por 10 minutos na temperatura ambiente. A integridade e concentração do DNA extraído é determinada por espectrofotometria de massa nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm.

4- Amplificação por PCR do gene *mcyB*

Para a amplificação do gene *mcyB* serão utilizados os primers descritos por Neilan et al.(1999): FAA (5_-CTATGTTATTTATACATCAGG-3_),RAA (5_-CTCAGCTTAACTTGATTATC-3_). As amplificações serão realizadas com soluções de 25µL em um termociclador Gene Amp 240 (Perkin, Elmer, Foster City, CA). As soluções de reação de reação irão conter 2µL de DNA (aproximadamente 2-5ng de DNA), 5pmol de cada primer (Phoneutria), 0,2µL do Tampão IC (Phoneutria), 2,5µL de dNTPs (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). Os seguintes parâmetros serão usados: 94°C por 2 min., 40°C por 20s, e 72°C por 1 minutos, seguido por uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

5-Amplificação por PCR do PC-IGS

Para amplificação do gene PC-IGS será utilizado o seguinte conjunto de oligonucleotídeos iniciadores PCbF (59-GGCTGCTTGTTCACGCGACA-39), e PCaR (59-CCAGTACCACCAGCAACTAA-39). A amplificação será realizada em solução contendo: Tampão para PCR 1X (20mM Tris-HCl pH8,4; 50mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 1,5mM de MgCl₂; 1,5U de Palatinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 10ng de DNA; 5pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA) esterilizada, para um volume final de 25µL. As reações serão realizadas em um termociclador Gene Amp 240 (Perkin, Elmer, Foster City, CA). Os seguintes parâmetros serão usados: 94°C por 4 min; 40 ciclos de 90°C/1 min., 50°C/1 min., 72°C/2 min; extensão final de 72°C por 12 minutos. A verificação do tamanho dos amplicons resultantes serão realizadas por comparação com o padrão de tamanho de DNA Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), depois de corrida eletroforética em tampão 0,5 TBE (1xTBE; 45mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0) em gel de agarose 1,2%. A documentação do gel será feita usando o programa "Multi Anayst" do "Fluor-S™ Multilmager" (BioRad). (Silva, C. S. P. da , 2006)

6-Clonagem

Na clonagem de seqüências de ficocianina produzidas na PCR será utilizado o kit "pGEM-T-Easy Vector System" (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

7-Transformação

A introdução do vetor contendo o inserto nas células competentes de *E. coli* DH5 α foi feita através de choque térmico. Alíquotas de 10 μ L do produto de ligação 100 μ L de suspensão células competentes de *E. coli* DH5 α serão misturadas em um microtubo esterilizado, o qual será incubado no gelo 30 minutos antes de que os experimentos sejam iniciados. O microtubo será transferido para banho-maria a 42°C por 30 segundos sem agitar. Em seguida o microtubo será incubado no gelo por 2 minutos. Posteriormente adiciona-se 250 μ L de meio SOC (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989) a temperatura ambiente e a mistura será incubada a 37°C durante 1 hora sob agitação de 200rpm. As células competentes transformadas serão plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) e X-Gal (Invitrogen), ambos em concentração final de 100 μ g/mL de meio. As placas são incubadas por 15 horas, a temperatura de 37°C.

8-PCR usando as colônias

Após o plaqueamento em meio de cultivo LB contendo ampicilina e X-Gal, uma colônia de cor branca foi utilizada para nova reação de PCR, visando confirmar a presença dos insertos de interesse. Uma pequena quantidade de células de cada clone transformado será adicionada a 25 μ L de reação de PCR utilizando-se os iniciadores: m13F (5'-GCCAGGGTTTTCCAGTCACGA-3') e m13R (5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'). A amplificação será realizada em solução contendo: Tampão para PCR 1X (20mM Tris-HCl pH8,4; 50mM KCl); 0,2 mM de cada dNTP; 1,5mM de MgCl₂ 3mM; 1,5U de Palatinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); 10ng de DNA; 5pmol de cada iniciador; água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA) esterilizada, para um volume final de 25 μ L. As reações serão realizadas em um termociclador Gene Amp 240 (Perkin, Elmer, Foster City, CA). Os seguintes parâmetros serão usados: 94°C por 54 min; 25 ciclos de 95°C/20s., 50°C/15 s., 60°C/1 min. A verificação do tamanho dos amplicons resultantes serão realizadas por comparação com o padrão de tamanho de DNA Low DNA Mass Ladder (Invitrogen), depois de corrida eletroforética em tampão 0,5 TBE (1xTBE; 45mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0) em gel de agarose 1,2%. A documentação do gel será feita usando o programa "Multi Anayst" do "Fluor-S™ Multilmager" (BioRad) (Silva, C. S. P. da , 2006).

9- Extração do DNA plasmidial

A extração de plasmídeos das células de *E. coli* DH5 α que continham os incertos será feita pelo método de preparação de pequena escala de plasmídeo, usando hidrólise alcalina, de acordo com Bimboim e Doly (1979) (Silva, C. S. P. da , 2006).

10-Sequenciamento

A PCR para o sequenciamento dos fragmentos inseridos nos plasmídeos será feita usando o kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences). Para a reação serão utilizados 200ng de plasmídeo contendo o inserto, 5pmol do primer M13F (5'-GCCAGGGTTTCCAGTCACGA-3'), 2µL de “DYEnamic”, 2µL de tampão 2,5X “Save Money” e água ultrapura para um volume final de 10µL. As condições de amplificação serão as seguintes: 25 ciclos de 95°C/20s., 50°C/15 s., 60°C/1 min. Após a amplificação dos fragmentos, será realizada a precipitação dos mesmos conforme manual de instruções do kit “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing”. Posteriormente as reações precipitadas serão inseridas no seqüenciador capilar ABI PRISM® 3100 genetic Analyser (Applied Biosystems).

11-Processamento e análise filogenética das seqüências

As seqüências geradas serão processadas para remoção de bases produzidas de baixa qualidade (índice de qualidade <20) através do pacote que contém os programas Phred/Phrad/Consed (Ewing; Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon; Abajian; Green, 1998)) em sistema operacional Linux. No alinhamento sequencial múltiplo dos genes da ficocianina que serão obtidas neste estudo, será utilizado o programa ClustalW (Thompson et al., 1994). O ajuste das extremidades das seqüências de DNA, para que todas elas possuam o mesmo número de bases e estejam completamente alinhadas será realizado com o auxílio do programa BioEdit (Hall, 2001). No cálculo da significância estatística da similaridade entre as seqüências será usada a análise de reamostragem (“bootstrap”) (Swafford, 1996) para 100 replicações. O método de distância (“Neighbour Joining”) (Saitou; Nei, 1987) será usado na construção da árvore filogenética. A visualização gráfica da árvore construída será observada por meio do programa Tree view (Page, 2001).

INSTALAÇÕES E EQUIPAMENTOS EXISTENTES

O projeto será executado no Laboratórios de Limnologia - Ecologia de Processos e Qualidade de Água e “Laboratório de Biologia Molecular” do ICB/UFMG:

1) Equipamentos disponíveis no Laboratório de Limnologia

01 Câmara ambiente para germinação modelo 347-CDG, microprocessada FANEM®

01 Fluxo Lamiar Veco® modelo HLFS-09M

02 Câmaras de Fuchs-Rosenthal

02 Redes para coleta de fitoplâncton (25um)

01 Microscópio Óptico Olympus®, modelo CBA

01 Autoclave

Pequenos equipamentos (banho Maria, vortex, vidraria, etc.)

Vários computadores conectados à Internet e sistema de revistas científicas on line (periódicos CAPES)

2) Equipamentos disponíveis no “Laboratório de Biologia Molecular”

Máquinas de PCR

Microcentrífuga

Fontes e cubas para eletroforese

ultrafreezer

Vários computadores conectados à Internet e sistema de revistas científicas on line (periódicos CAPES)

Seqüenciador

CUSTOS

Descrição	Quantidade	Valor unitário (R\$)	Sub-Total (R\$)
Kit de sequenciamento de DNA	1	3.100	3.100,00
Resinas para biologia molecular	10	270,00	2.700,00
Micropipetas automáticas	5	700,00	2.500,00
Sais e tampões diversos	20	100,00	2.000,00
Solventes diversos	20	30,00	600,00
Síntese de oligonucleotídio	20	100,00	2.000,00
Agarose 1 kg	1	1.300,00	1.300,00
Material para PCR	20	250,00	5.000,00
Kit de clonagem	4	214,00	856,00
Padrão de peso molecular	5	400,00	2.000,00
Material plástico	50	60,00	3.000,00
Vidros para cultivo e repique		680,00	680,00
Reagentes		1.000,00	1.000,00
Ampicilina	2	14,34	28,68
Materiais de laboratório		1.000,00	1.000,00
Manutenção de equipamentos			5.000,00
Combustível/despesas de veículo	20	2,50	50,00
Total			32.814,00

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arment, A. R. & Carmichael, W. W., 1995. EVIDENCE THAT MICROCYSTIN IS A THIOTEMPLATE PRODUCT. *Journal of Phycology*. V. 32, p. 591-597.
- AZEVEDO, S.M.F.O. (1996). TOXIC CYANOBACTERIA AND THE CARUARU TRAGEDY. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia.
- Campos, M. O., 2006. OCORRÊNCIAS DE FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS EM RESERVATÓRIOS DE ABASTECIMENTO NO BRASIL –IMPLICAÇÕES REGIONAIS E LEGISLAÇÃO. Monografia (Especialização em Gerenciamento Municipal de recursos hídricos) UFMG. 65p.
- CARMICHAEL, W.W.; AN, J.S.; AZEVEDO, S.M.F.O.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; JOCHIMSEN, E.M.; HOLMES, C.E.M & SILVA, J.B. (1996) ANALYSIS FOR MICROCYSTINS INVOLVED IN OUTBREAK OF LIVER FAILURE AND DEATH OF HUMANS AT A HEMODIALYSIS CENTER IN CARUARU, PERNAMBUCO, Brazil. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia
- Décio A. C. Beato, Marcelo J. Medeiros, Michael G.P. Drews, Georgete M. Dutra IMPACTOS URBANOS EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS –BACIA DA LAGOADA PAMPULHA, BELO HORIZONTE-MG Rev. Águas Subterrâneas no 17/ Maio 2003.
- Dittmann et al., 1997. INSERTIONAL MUTAGENESIS OF PEPTIDE SYNTHETASE GENE WHICH IS RESPONSIBLE FOR HEPATOTOXIN PRODUCTION IN THE CYANOBACTERIUM *Microcystis* PCC7806. *Molecular Microbiology*, V. 26. p. 779-787.
- Goodwin, K.L. DINÂMICA DAS POPULAÇÕES DE CYANOBACTERIA NO RESERVATÓRIO DA PAMPULHA (MG) EM DUAS ESCALAS TEMPORAIS (SAZONAL E DIURNA) – Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais - 19976
- Guillard, R. R. & Lorenzen, C. J., 1972. YELLOW-GREEN ALGAE WITH CHLOROPHYLLIDE C_{1,2}. *J. Phycol.* V.8, P. 10-14
- Lorenzi, A. S., 2004. ABORDAGENS MOLECULARES PARA DETECTAR CIANOBACTÉRIAS E SEUS GENÓTIPOS PRODUTORES DE MICROCISTINAS PRESENTES NAS REPRESAS BILLINGS E GUARAPIRANGA, São Paulo, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) – Universidade de São Paulo
- Neilan, B. A.; Jacobs, D.; Goodman, A, 1995. GENETIC DIVERSITY AND PHYLOGENY OF TOXIC CYANOBACTERIA DETERMINED BY DNA POLYMORPHISMS WITHIN THE PHYCOCYANIN LOCUS. *Applied and environmental microbiology*. p. 3875–3883
- Neilan, B. A.; Dittmann, E.; Rouhiainen, L.; Bass, A. ; Schaub, V.; Sivonen, K.; Bonner, T., 1999. NONRIBOSOMAL PEPTIDE SYNTHESIS AND TOXIGENICITY OF CYANOBACTERIA. *J. Bacteriol.* v.181. p.4089-4097
- Page, R. D. M., 2001. TREE REWIU. – version 1.6.6 Glasgow: University of Glasgow

- Runnegar, M. T. C. & Falconer, I. R, 1986. EFFECTS OF TOXIN FROM THE CYANOBACTERIUM MICROCYSTIS AERUGINOSA ON ULTRASTRUCTURAL MORPHOLOGY AND ACTIN POLYMERIZATION IN ISOLATED HEPATOCYTES. *Toxicon*, v. 24, p.109-115
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T., 1989. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2 ed. Cold Harbor. Cold Spring Harbor laboratory Press
- Silva, C. S. P. da , 2006. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CIANOBACTÉRIAS BRASILEIRAS E DISTRIBUIÇÃO DE GENES DE PRODUTOS NATURAIS. Piracicaba, Brasil. Dissertação (Mestrado na área de Biologia na agricultura e no ambiente) Universidade de São Paulo
- http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/bolarios/Doctorado/guiont2.gif
- <http://ecologia.icb.ufmg.br/~rpcoelho/comunidades/Lagoa/Pagina%20inicial.htm>
- <http://ecologia.icb.ufmg.br/~rpcoelho/comunidades/tributarios/tributarios/Index1.htm>
- <http://www.copasa.com.br/>

Universidade Federal de Minas Gerais

Departamento de Bioquímica

Biologia molecular

Pareceres sobre os projetos de biologia molecular

Ana Raquel de Oliveira Santos

Débora Chaves Moraes

Iara Christina Campos

Luciana Leite Fraga

Natália Lourenço de Almeida

Raquel Maria Cordeiro Santos

Belo Horizonte

2007

Grupo 01 - Análise da influência da temperatura na expressão gênica do receptor CD11b em neutrófilos

Proposta do grupo

Objetivos do grupo

- c. Geral: Verificar em qual etapa da expressão do receptor de membrana CD11b em neutrófilos há a regulação pela temperatura.
- d. Específicos:
 - Verificar quais genes estão expressos em diferentes temperaturas (Técnica Microarray)
 - Analisar a influência da temperatura na taxa de transcrição do gene para CD11b (Técnica Nuclear Run On)
 - Determinar a quantidade de mRNA para CD11b em neutrófilos em diferentes temperaturas (Real Time PCR)
 - Determinar a variação da quantidade de CD11b na membrana de neutrófilos em diferentes temperaturas (FACS – Citometria de Fluxo)
 - Tentar correlacionar os dados obtidos com a função fisiológica da febre

Avaliação crítica

Os estudos a respeito da febre são bastante antigos, porém há ainda muito a se descobrir a respeito da expressão gênica na regulação da temperatura. Portanto, o projeto é considerado pertinente. Os objetivos descritos são bastante claros. Além disso, o grupo se propõe a novos experimentos conforme os resultados forem sendo observados, assim, é possível perceber a viabilidade de execução do projeto. Com a metodologia escolhida, é perceptível o fato de que os objetivos poderão ser claramente alcançados. O orçamento, apesar de alto está dentro do esperado para um projeto de tal porte.

Grupo 02 - Análise Populacional e Evolutiva em Duas Espécies de *Acianthera* (Orchidaceae)

Proposta do grupo

Objetivos do grupo

- Geral: Analisar molecularmente cinco populações de *A. prolifera* e a única existente de *A. fornograndensis* com enfoque em possivelmente sinonimizar as espécies e traçar o caminho evolutivo das populações.
- Específicos:
 - Coletar amostras de tecido foliar de 15 indivíduos aleatórios de *A. prolifera* de uma população de Minas Gerais (Serra do Caraça), da Bahia, do Distrito Federal, da Venezuela e da Bolívia;
 - Coletar amostras de tecido foliar de 15 indivíduos aleatórios de *A. fornograndensis* da população conhecida do Espírito Santo;
 - Extrair material genético de todos os indivíduos amostrados;
- Amplificá-lo pela técnica de PCR;
- Seqüenciar algumas regiões do material genético;
- Comparar a homologia das seqüências de todos os indivíduos e elaborar uma história evolutiva.

Avaliação crítica

Estudos sobre o gênero *Pleurothallis* da família Orchidaceae já são bem descritos na literatura. Porém, o subgênero *Acianthera* foi recentemente classificado como gênero, deixando o complexo *A. prolifera* como uma incógnita. O projeto é pertinente já que visa solucionar este problema. Os objetivos do grupo provavelmente serão alcançados, uma vez que são bem definidos. Além disso, o orçamento é bastante viável.

Grupo 05 - Estudo evolutivo do gene codificador da mioglobina em gastrópodes limnicos (Pulmonata: Basomatophora).

Proposta do grupo:

O projeto em questão tem como objetivo analisar a evolução do gene da mioglobina em gastrópodes basomatóforos através da análise de seqüências homólogas e posicionamento de íntrons.

Dentro deste objetivo gerais destacam-se os seguintes objetivos específicos:

- sequenciamento do cDNA da mioglobina dos táxons considerados representativos dentro de basomatophora.
- sequenciamento completo do gene da mioglobina evidenciando a posição dos íntrons.
- avaliação da possibilidade de se usar este gene como marcador molecular para o reconhecimento da filogenia em gastrópodes pulmonados.
- criação de um banco de dados de cDNA clonado de vários táxons de basomatophora para futuras análises estruturais e funcionais da mioglobina.

Avaliação crítica:

Devido à sistemática problemática dos basomatóforos, encontrar um possível marcador molecular torna-se necessário, principalmente quando se leva em consideração a importância médico-veterinária do grupo. Além disso, também é relevante a obtenção de resultados conclusivos para a origem monofilética do gene da mioglobina.

Um dos pontos que se pode considerar a favor em relação a este projeto é que ainda não se tem dados relevantes que ajudem a entender a filogenia de basomatóforos e a criação de um banco de dados pode ter grande importância em estudos posteriores, porém é um projeto com certo grau de complexidade e seria interessante fazer um “piloto” para se certificar que as técnicas utilizadas e os primers escolhidos seriam realmente os mais indicados, principalmente para não haver dúvidas na hora do requerimento para o financiamento que gira em volta de R\$ 50.000,00.

Grupo 06 - Comparação de isoformas presentes no veneno das espécies de *Loxosceles* de maior importância clínica no Brasil

Proposta do grupo

O grupo pretende realizar um estudo comparativo entre as isoformas protéicas presentes no veneno de quatro espécies do gênero *Loxosceles* (*L. Laeta*, *L. Gaucho* e *L. Similis*) e construir uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno das três espécies. Para tal o grupo pretende sequenciar as isoformas presentes no veneno de cada espécie; selecionar as proteínas mais imunoreativas para uma análise *a posteriori*; apontar as isoformas mais conservadas entre as espécies através de softwares de bioinformática.

Avaliação crítica

O grupo das aranhas marrons apresenta risco em potencial para a população, pois tratam-se de aranhas de importância médica. O acidente causado por tais aracnídeos gera um quadro de dermonecrose severa, podendo causar também o efeito sistêmico de hemólise intravascular.

Atualmente o acidente com *Loxosceles* não tem diagnóstico específico e há grande dificuldade em identificar os sinais clínicos. O trabalho proposto é pertinente, pois visa identificar as proteínas causadoras da necrose característica do veneno das aranhas marrons. Outro ponto positivo do trabalho é a perspectiva de se desenvolver um soro mais específico para aranhas do gênero *Loxosceles*, a partir das proteínas causadoras da necrose.

Pela metodologia apresentada, os objetivos serão alcançados.

Durante a apresentação, foi afirmado que os acidentes com aranhas marrons têm aumentado, mas não foram mostrados dados epidemiológicos que comprovem tal afirmação.

Grupo 07- Silenciamento dos genes *ldh* e *ack* de *Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermosaccharolyticum* afim de aumentar a eficiência de produção de Etanol

Proposta do grupo:

O projeto em questão tem como objetivo geral utilizar técnicas de biologia molecular para silenciar os genes de *Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermosaccharolyticum*, que codificam as enzimas acetato cinase e lactato desidrogenase, com o intuito de aumentar a quantidade de produtos que serão utilizados na via de produção do etanol.

Os objetivos específicos são:

- Selecionar mutantes de *C. thermosaccharolyticum* para a produção de acetato kinase através de tratamento com nitrosoguanidina.
- Identificar o gene responsável pela produção da enzima lactato desidrogenase em *C. thermosaccharolyticum*.
- Construir vetores knockout para os genes *ack* e *ldh* de *C. thermocellum* e *ldh* de *C. thermosaccharolyticum*.
- Inserir o vetor knockout nas bactérias *C. thermocellum* e *C. thermosaccharolyticum* através de eletroporação.
- Testar a produção de etanol

Avaliação crítica:

O projeto proposto apresenta grande relevância, pois propõe o desenvolvimento e intensificação da produção de uma fonte alternativa de energia, o álcool, a partir de celulose metabolizada por organismos (*Clostridium thermocellum* e *Clostridium thermosaccharolyticum*) que oferecem várias vantagens em sua utilização. Assim, esse projeto envolve também questões econômicas e ambientais, influenciados pela biotecnologia.

E necessário melhor análise para que o cronograma proposto esteja de acordo com o tempo necessário para a realização dos experimentos e o valor estipulado esteja de acordo com os materiais utilizados , considerando possível repetição de experimentos.

Grupo 08 - Análise do papel das proteínas do complexo Polycomb na proliferação de células de melanoma.

Proposta do grupo:

O projeto em questão tem como objetivo analisar o papel das proteínas do complexo Polycomb na proliferação de melanócitos tumorais através da utilização da técnica de RNAi.

Dentro deste objetivo geral pode-se destacar os seguintes objetivos específicos:

- Comparar a expressão de genes do complexo Polycomb entre cultura de células de melanoma e melanócitos de epitélio normal.
- Analisar a expressão das proteínas cujo mRNA apresentou super expressão.
- Silenciar os genes que estão super expressos no tecido tumoral comparado com os melanócitos normais.
- Verificar se haverá diminuição na proliferação celular das células cancerosas após o silenciamento de gene específicos das proteínas do Polycomb.

Avaliação crítica:

A existência de estudos recentes mostraram que componentes do complexo Polycomb estão super expressos em certos tipos de câncer. Devido a estes estudos torna-se importante estudar o papel deste complexo nos diversos tipos de câncer para se poder compreender o mecanismo e possivelmente ajudar no tratamento do câncer.

Apesar da importância evidente do estudo deve-se prestar atenção se será realmente possível verificar com o silenciamento a diminuição da proliferação celular, pois um projeto que gira em torno de R\$70.000,00 não conseguirá financiamento se deixar dúvidas sobre a eficácia de sua execução.