

Projeto de Biologia Molecular
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Estudo sobre a variação da expressão
da hBD-2 e hBD-3 em queratinócitos expostos ao
fungo *Malassezia furfur*

Alunos:
Eudes Barbosa
Gabriel Fazito
Luara Augusta
Marina Walker
Mariana Dias
Nathália Vieira

Professor: José Miguel Ortega

Belo Horizonte
Dezembro de 2007

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	3
Introdução e justificativa	4,5
Objetivo Geral	6
Objetivos Específicos	6
Material e Métodos	7
Cultivo do <i>M. furfur</i>	7
Cultura celular de queratinócitos	7
Tratamento dos queratinócitos com <i>M. furfur</i>	8
PCR em tempo real.....	8
Western Blotting	9,10
Cronograma	11
Orçamento Previsto	12
Referências Bibliográficas	13

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

hBD-2 β -defensinas humanas 2

hBD-3 β -defensinas humanas 3

PBS Phosphate-buffered saline

PCR Polymerase chain reaction

SFM Meio soro-free

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Micoses superficiais são afecções causadas por fungos que se localizam na camada queratinizada da pele, mucosas e anexos, podendo em raros casos invadir a camada da derme. Normalmente não induzem uma resposta imunitária, provocando apenas inflamação local. O grupo de micoses mais comuns, denominado cerafitoses, é caracterizado por fungos que se proliferam na camada córnea da pele ou sobre a haste livre de pelos, sem consumir queratina. Um patógeno muito comum é a denominado *Malassezia furfur*, um basideomiceto saprofita existente na camada córnea da pele de mais de 90% da população hígida. É lipodependente, e está associado a diversas doenças cutâneas, incluindo dermatite atópica, foliculite, dermatite seborréica e mais comumente a pitíriase versicolor. Existe em duas formas morfológicas: a levedura, chamada de *Pityrosporum ovale*; e o micélio. A patogenicidade desse e de outros fungos está associada ao fato de terem sua temperatura ideal de crescimento por volta dos 37°C e de produzirem determinadas enzimas como urease, fosfolipase, lipase e protease. Estas enzimas são responsáveis pela propagação do fungo no hospedeiro, facilitando a invasão através da degradação da pele ou mucosa (Silveira; A. C. B. *et al*). A pitíriase versicolor é uma micose superficial de ocorrência universal causada por essa levedura. Aparece após a puberdade, quando as células sebáceas estão mais desenvolvidas. O fungo, porém, causa uma síndrome muito freqüente no período neonatal, conhecida como dermatite seborréica (Cláudio de Lélis Filgueiras de Souza *et al*). A infestação predomina em áreas corporais ricas em glândulas sebáceas, (couro cabeludo, face e tronco superior) por necessitarem de ácidos graxos para sua nutrição. Quando provocam a dermatose, são encontradas em grande quantidade, normalmente associadas a hifas rudimentares ou pseudohifas.

Quase sempre as lesões são assintomáticas, caracterizadas por manchas múltiplas e confluentes, de cor variável de acordo com o paciente. Essa hipocromia é explicada não só pela barreira física aos raios ultravioleta do sol, mas principalmente pela produção de ácidos dicarboxílicos pelo metabolismo do fungo, com efeito tóxico aos melanocitos. Por não desencadearem resposta

imunológica e por serem infecções pouco lesivas, são consideradas primariamente uma doença estética, o que normalmente leva ao tratamento.

Os queratinócitos formam a principal população de células das epidermes, sendo responsáveis pela formação das suas cinco camadas: camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (Junqueira & Carneiro, 2004). Pela sua localização são considerados a primeira barreira física de proteção do organismo. Entretanto, não são apenas uma barreira física. Eles são as primeiras células a entrar em contato com antígenos externos e reconhecê-los por receptores do Sistema Imune Inato. Esses receptores estão associados a uma grande variedade de patógenos, incluindo bactérias, vírus, fungos e protozoários (Garcia-Madrid & Islas-Rodríguez, 2007).

As β -defensinas são uma classe de peptídeo ubíqua a tecidos epiteliais do organismo de mamíferos e também estão presentes em plantas, invertebrados e vertebrados em geral. Em humanos, foram identificados até 40 ORF's com sequências de nucleotídeos com as assinaturas moleculares das defensinas, embora somente 10 destes tenham sido identificados *in vivo* como produtos proteicos e outros 11 adicionais produzindo RNAm. Estas β -defensinas foram relacionadas a processos inflamatórios e quimiotaxia de células do sistema imune, controle da replicação viral, diferenciação de queratinócitos e, principalmente, por sua potente atividade antimicrobiana. Por parte desta última atividade, iremos analisar os efeitos da hBD-2 e hBD-3 (*human Beta Defensin*) na resposta contra a infecção fúngica já previamente citada em queratinócitos, peptídeos estes já sequenciados e cuja conformação já é conhecida. Estes estudos poderão ampliar nossa compreensão de como as interações entre organismos naturalmente habitantes de nosso epitélio externo e reconhecidamente saprófagos podem se alterar tornando-os patogênicos subitamente, ao analisar a expressão das seguintes β -defensinas durante sua infecção.

OBJETIVO GERAL

Analisar a variação da expressão da hBD-2 e hBD-3 em queratinócitos expostos ao fungo *Malassezia furfur*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Verificar através de *Real Time* PCR a expressão das β -defensinas humanas 2 e 3 de queratinócitos expostos ao fungo *M. furfur*.
- 2) Determinar através de Western blotting a produção das β -defensinas na situação citada.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo do *M. furfur*

M. furfur (ATCC 12078) será cultivado por 4 dias a 30°C em meio ágar dextrose Sabouraud contendo peptona (1%), glicose (4%), óleo de oliva (2%) e Tween 80 (0.2%).

Cultura celular de queratinócitos

Queratinócitos humanos serão obtidos da pele de adultos normais (doadores voluntários). A pele será deixada *overnight* em meio com dispase (Sigma-Aldrich) a 4°C. Posteriormente lâminas epidérmicas serão removidas a partir da derme e suspensões celulares serão obtidas ao se colocar as lâminas epidérmicas em 0.05% tripsina/0.53mM EDTA por 15min a 37°C. Após incubação, a tripsina terá sua atividade bloqueada ao ser adicionado 10ml de inibidor de tripsina de soja (Life Technologies) e a suspensão celular de queratinócitos será centrifugada. O pellet celular resultante será cultivado em meio definido para queratinócito (meio para queratinócitos soro-free, SFM; Life Technologies) a uma densidade de aproximadamente 3×10^6 células por frasco de 15ml de meio completo. A contagem celular será feita através de uma câmara hemocitométrica, usando exclusão de tripiano blue para monitorar a viabilidade celular. A concentração total de cálcio no meio será mantida a 0.09mM. Ensaio com transglutaminase será usado para medir a diferenciação de queratinócitos. As culturas com queratinócitos será mantida adicionando meio completo fresco a cada 2-3 dias.

Tratamento dos queratinócitos com *M. furfur*

Os queratinócitos humanos foram tratados com *M. furfur* (30:1), e durante o tratamento a concentração total de cálcio no meio foi mantida a 0.12mM. A endocitose será avaliada da seguinte forma: as células serão cultivadas em uma monocamada sobre lâminas com e sem *M. furfur*. Essas lâminas serão retiradas com 24, 48 e 72 h, lavadas com solução salina PBS e mantidas com corante May-Grumwald por 5min. Depois as células serão lavadas em PBS e colocadas em Giemsa por 15min (em uma diluição de 1:20 com PBS). As lâminas serão montadas e vistas em microscópio óptico. A porcentagem de endocitose será determinada após contagem de queratinócitos em que houve penetração do *M. furfur*.

Análise da expressão dos genes para hBD-1 e hBD-2 em *Real Time PCR*

A expressão do mRNA dos genes que codificam as β -defensinas 1 e 2 (hBD-1 e hBD-2) será testada com a técnica *Real Time PCR*. O RNA total das células tratadas com *M. furfur* e das células não expostas ao fungo será isolado através do kit High Pure Isolation(Roche Diagnostics). Esse kit inclui a utilização da enzima DNaseI para eliminação de DNA, evitando, assim, a contaminação nas etapas posteriores do estudo. A concentração dos mRNA será indicada pela leitura em espectrofotômetro de comprimento de onda de 260nm. O mRNA, então, será submetido à enzima transcriptase reversa (Roche Diagnostics) a 42°C por 45 min de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O produto da reação com a transcriptase reversa - o cDNA - será amplificado e quantificado, utilizando sondas TaqMan. Inicialmente, as seqüências sugeridas para primers e sondas são as seguintes: forward primer para a β -defensina -2: GACTGAGTCTTGCTCTGTCCG, reverse primer: GGCATGATGGCTTACGCCTATA, sonda: AGCGACTCCTGTGCCTCAGCCTCC; forward primer para a β -defensina-3: TGAAGCCTAGCAGCTATGAG GATC reverse primer: CCGCCTCTGACTCTG CAATAA , sonda:

TTGGTGCCTGTTCCAGGTCATGGAG. Como as seqüências sugeridas são passíveis de alterações, tendo em vista o processo de padronização da PCR, outras seqüências para as sondas TaqMan e para os primers poderão ser preparadas por meio do Beacon Designer 2.06 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA). Os ensaios serão preparados seguindo os protocolos sugeridos pela sonda TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) em um iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA). O iCycler Optical System Interface (Bio-Rad) analisará e quantificará as amostras.

Western Blotting

Uma análise qualitativa e quantitativa da expressão de hBD-2 e hBD-3 foi feita através da técnica de Western Blotting. Com esse objetivo, células das culturas de queratinócitos controle e tratados com *Malassezia furfur* foram utilizadas. As amostras foram preparadas por lise direta de 10^6 células, em 20 ml de tampão de lise (10 mM EDTA, 60mM de pirofosfato, 40mM tris-HCl pH 6,8), acrescida de 20 ml de SDS (solução a 10%) e 20 ml de tampão de amostras (115 mM tris-HCl pH 6,8; 15% SDS; 10% de glicerol; 100 mM de 2-b-mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol) para a extração das proteínas totais e incubadas a 95°C por 10 minutos, sendo mantidas a 200°C até serem usadas. Após aquecimento a 100°C durante 5 min, as proteínas foram separadas por eletroforese contínua a 150 V em gel de acrilamida/bis-acrilamida 15%. Padrão de peso molecular de proteínas também foi processado em todos os géis para a investigação do peso molecular das amostras testadas. Após a corrida dos géis, as proteínas separadas foram transferidas para membranas de nitrocelulose Immobilon-P (Millipore, Billerica, EUA) a 24 V por 12 h e a 48 V durante 1 h. A confirmação da transferência foi realizada pela coloração das membranas com reagente de Ponceau (Ponceau S 0,1%, Ácido acético glacial 3%, Água destilada). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com soro normal de coelho (NRS) 10% (para hBD-2 e hBD-3) durante 1 h. Em seguida, procedeu-se a lavagem das membranas em PBS-tween 0,05% e a incubação das mesmas com anticorpos primários para hBD-2 (1:100) e hBD-3 (1:100) (Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas em PBS-tween 0,05% e incubadas com anticorpos secundários de cabra contra coelho (1:1000 para os ensaios de hBD-2 e hBD-3) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) por 1 h a temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS-tween 0,05%, as membranas foram incubadas no em solução de complexo avidina biotina (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, EUA) durante 30 min, lavados com PBS-tween 0,05% e PBS. A reação foi desenvolvida pela adição de solução de 3,3'diaminobenzidina em PBS contendo cloronaftol 0,05%, metanol 16,6% e H₂O₂. A reação foi cessada em água destilada.

A intensidade da expressão de hBD-2 e hDB-3 foi calculada usando o programa Scion Image (www.scioncorp.com), como descrito previamente {Hansen et al., 2003}. Resumidamente, as membranas de Western Blotting foram digitalizadas e salvas no formato TIFF. As bandas positivas para cada anticorpo foram delimitadas e a intensidade da reação medida com uma área constante. A intensidade final foi determinada subtraindo a intensidade do *background* dos valores positivos para cada banda.

CRONOGRAMA

Cronograma													
	2008						2009						
Bimestres	1º	2º	3º	4º	5º	6º	1º	2º	3º	4º	5º	6º	
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Cultura de queratinócitos	X	X											
Cultivo do fungo	X	X											
Padronização do RT-PCR			X	X									
Execução do RT-PCR					X	X							
Execução do Western Blotting							X	X					
Análise dos dados					X	X	X	X	X	X			
Comunicação em eventos				X	X	X	X	X	X	X			
Redação e apresentação dos resultados									X	X	X	X	

ORÇAMENTO PREVISTO

Anticorpos (valores não incluem custo de envio) – Santa cruz Biotechnology

U\$248,00 β -defensin 2 (C-17): sc-10854

• goat polyclonal IgG, 200 μ g/ml • epitope mapping near the N-terminus of β -defensin 2 of human origin • recommended for detection of precursor and mature β -defensin 2 of human origin by WB and IF • blocking peptide, sc-10854 P

U\$248,00 β -defensin 2 (FL-64): sc-20798

• rabbit polyclonal IgG, 200 μ g/ml • epitope corresponding to amino acids 1-64 representing full length β -defensin 2 of human origin • recommended for detection of β -defensin 2 of human origin by WB, IP and IF

U\$248,00 β -defensin 3 (I-16): sc-10860

• goat polyclonal IgG, 200 μ g/ml • epitope mapping near the N-terminus of β -defensin 3 of mouse origin • recommended for detection of precursor and mature β -defensin 3 of m and r origin by WB and IF • blocking peptide, sc-10860 P

U\$248,00 β -defensin 3 (FL-67): sc-30115

• rabbit polyclonal IgG, 200 μ g/ml • epitope corresponding to amino acids 1-67 representing full length β -defensin 3 of human origin • recommended for detection of β -defensin 3 of human origin by WB, IP and IF

RIPA Buffer – Sigma Aldrich

U\$155,80

Kit SDS PAGE – SERVA

\$133.09; para 25 aplicações.

PBS Tween – LBM Laboratório

U\$35.86; 1000ml, pH 7,4

Membrana de nitrocelulose – LBM Laboratório

R\$ 210,00; membrana em nitrato de celulose, 0, 0,45 μ m, diam.47mm, quadriculada. Marca Sart.

Papel de filtro – LBM Laboratório

R\$ 4,00; Papel filtro qualitativo, diam.12,5cm, pct.c/100un. Marca Qual.

Beacon Designer – Premier Biosoft
U\$ 2185,00

Agitador de tubos tipo vortex – LBM Laboratório
R\$ 180,00; Construído para homogeneização de microtubos de 1,5ml a tubos de 50ml em plástico ABS e base de ferro fundido. Possui pés de borracha p/fixação na bancada. Modo de operação contínuo ou toque(pulso). Velocidade fixa de 2800rpm. Voltagem 110 ou 220 (indicar). Possui pés de borracha p/melhor fixação. Dimensões 100x125x125mm (LxPxA), peso 1,45g. Consumo 40w. Marca Biom.

BioRad iCycler – BioRad
U\$ 29,900; BioRad iCycler IQ Real-Time PCR Detection System

TaqMan Mix – Applied Biosystems
U\$ 169,00

Sistema Semi-dry Blotter – Invitrogen
U\$ 884,00; Novex® Semi-dry blotter

Eppendorfs 1,5ml – Axygen
R\$ 33,90; (Tubo Eppendorf 1,5 ml, graduado, tampa com trava, Axygen, cor Neutra, fabricado em polipropileno atóxico 99,9% de pureza, livre de DNASE, RNASE, embalagem com 500 pçs, MCT 150C.)

Eppendorfs 0,5ml – Axygen
R\$ 69,90; (Tubo Eppendorf 0,6 ml, graduado, tampa com trava, Axygen, cor Neutra, fabricado em polipropileno atóxico 99,9% de pureza, livre de DNASE, RNASE, embalagem com 1.000 pçs)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- García-Madrid, L. A., Islas-Rodríguez A. E.. "*Keratinocytes from human skin respond as typical immune cells after stimulation with Trichophyton rubrum*". Rev Immunol, 2007 - precedings.
- Junqueira, L.C.; Carneiro, J.. "*Histologia Básica*". 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- Crovella S, Antcheva N, Zelezetsky I, Boniotto M, Pacor S, Verga M and Tossi A. *Primate β -defensins – structure, function and evolution*. Curr Protein Pept Sci. 2005; 6: 7-21.
- Quinones-Mateu, M.E., Lederman, M.M., Feng, Z., Chakraborty, B., Weber, J., Rangel, H.R., Marotta, M.L., Mirza, M., Jiang, B., Kiser, P., Medvik, K., Sieg, S.F. and Weinberg, A. (2003) Aids, 17, F39-48.
- Souza, Claudio L. F.; Marangon, Joel F.:(1996) *Pesquisa da Malassezia furfur em couro cabeludo de lactentes*. VOLUME 71 Nº 4: Investigação clínica, epidemiológica, laboratorial e terapêutica
- Silveira, Ana C. B.; oliveira, Neiva T.; Neves, R. P., Magalhães, Oliane. M. C.; Queiroz, Lunisete A. *Physiological characterization of monocellular and not monocellular cultures of the Malassezia*
- Donnarumma G, Paoletti I, Buommino E, Orlando M, Tufano MA, Baroni A. 2004. *Malassezia furfur induces the expression of β -defensin-2 in human keratinocytes in a protein kinase C-dependent manner*. Archives of Dermatological Research, 295 : 474–481.
- Bals, R, 2000. *Epithelial antimicrobial peptides in host defense against Infection*. Respiratory Research, 1:141–150.
- Saitoh M, Kurashige Y, Yamazaki M, et al, 2007. *Increased expression of β -defensin-2 and -3 during the development of autoimmune sialoadenitis in MRL/lpr mice*. Medical molecular morphology, 40:157–162.

PARECERES DOS OUTROS PROJETOS

GRUPO 1

Parecerista: Nathália Vieira

Professor: Miguel Ortega

Projeto

A técnica pro-drug combinando o adHSVtk e a droga GCV como uma estratégia de terapia gênica

Proposta do projeto

O grupo pretende verificar a eficiência da *pro-drug activation therapy* em diferentes tipos de células cancerígenas, bem como os efeitos na expressão gênica das mesmas. Para isso eles utilizarão células normais e cancerosas (com câncer de próstata, câncer de mama e câncer de colo do útero). Será produzido vetores adenovirais e as técnicas utilizadas serão: Westerning blotting, eletroforese de campo pulsátil e microarranjo.

Relevância e Viabilidade

Esse projeto tem grande relevância uma vez que eles procuram expandir procuramos expandir a técnica HSV-TK/GCV que tem se mostrado efetiva na maioria dos casos de combate a tumores cerebrais e já está em nível III de pesquisa, para outros tipos de tumores, ou seja, eles propiciar uma nova alternativa no tratamento do câncer.

O trabalho em si é viável porém as técnicas utilizadas são caras, então teria que existir um grande investimento. E esse é um projeto trabalhoso, então além do investimento financeiro seria necessária a presença de uma equipe treinada para garantir o cumprimento do projeto no prazo de 2 anos.

GRUPO 3

Parecerista: Luara Augusta
Professor: Miguel Ortega

Projeto: Transcrição gênica de RNA mensageiro ligados a tigmomorfogênese em *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae)

Objetivo do projeto:

O trabalho consiste em expor a planta *Arabidopsis thaliana* a uma situação de estresse mecânico, no caso, uma corrente de ar constante e analisar a expressão gênica nesse estado. Uma planta sem exposição ao estresse será o controle.

Relevância

A relevância do projeto reside na importância que a produção de plantas tem para a sociedade. Indústrias que desejariam ter sua plantação com um crescimento direcionado para o fim que se deseja, como troncos mais altos ou mais ramificado.

Viabilidade

Tendo em vista os materiais e os métodos propostos, o projeto possui uma boa viabilidade. Os obstáculos para que essa viabilidade efetive-se são os protocolos em si. O protocolo sugerido para a extração do mRNA vegetal deve garantir uma amostra pura e livre de contaminação, isso será conseguido apenas com a feitura de diversos testes. O mesmo aplica-se aos protocolos de RT-PCR e a realização do microarranjo.

Crítica

A realização desse projeto engrandeceria os conhecimentos sobre o comportamento dos genes em vegetais, levando a uma melhor compreensão da vida vegetal. Além disso, estimularia a criação de estratégias de utilização dos

conhecimentos científicos a favor do mercado madeireiro, de papel, entre outros, promovendo, assim, novas perspectivas na produção de plantas para o mercado.

Grupo 4

Parecerista: Mariana Oliveira Dias
Professor: Miguel Ortega

Projeto: Desenvolvimento de eucalipto transgênico para a recuperação de áreas contaminadas por metais pesados

Objetivo do projeto:

O grupo propõe criar exemplares transgênicos híbridos de eucalipto (*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*) que expressarão fitoquelatinas (moléculas transportadoras que armazenam em vesículas o metal pesado). Essas plantas são uma proposta de recuperação de solos contaminados por metais pesados e de áreas degradadas.

Relevância:

Projeto de grande importância na sociedade atual. A criação de plantas resistentes a metais pesados pode implicar na recuperação de solos já contaminados, já que elas armazenariam em suas folhas o metal. Provavelmente, o projeto terá um impacto social e político muito grande, já que a questão da transgenia permanece polêmica no Brasil.

Viabilidade:

O projeto visa à produção de eucaliptos geneticamente modificados. Os materiais e métodos estão de acordo com o objetivo proposto. Porém, algo que prejudicaria o desenvolvimento do trabalho é o tempo disponível para a execução do mesmo (2 anos), já que a produção de transgênicos requer um tempo considerável. A criação de plantas geneticamente modificadas tem uma dificuldade: a incorporação do gene das fitoquelatinas no grão de pólen ou nas células do óvulo.

Como o projeto pretende recuperar solos e áreas degradadas, a quantidade de mudas desejadas é de grande importância. Porém, caso as plantas transgênicas não consigam passar verticalmente esse gene, se necessitará de uma constante demanda de produção de mudas novas.

Crítica:

Projeto bastante ambicioso e de importância ambiental. E execução do projeto levaria a novas perspectivas de recuperação de áreas degradadas e solos contaminados com metais pesados. Além disso, possui as vantagens de colaborar com o PIB nacional, produção de novos empregos e desenvolvimento da biotecnologia do país.

GRUPO 5

Parecerista: Eudes Barbosa

Professor: Miguel Ortega

Projeto: Aspectos peculiares de Leucemia em crianças com Síndrome de Down

Objetivos do projeto

O estudo irá Comparar o proteoma de pacientes normais leucêmicos com o proteoma de pacientes com Síndrome de Down leucêmicos, antes e depois de submetidos aos tratamentos quimioterápicos.

Relevância

O projeto apresenta alta relevância, uma vez que indivíduos com Síndrome de Down respondem melhor aos tratamentos quimioterápicos. Estabelecidos os mecanismos que promovem essa melhor resposta em portadores de Down será possível elaborar melhores tratamentos para indivíduos normais.

Viabilidade

Tendo em vista os materiais e os métodos propostos, o projeto possui boa viabilidade. Empecilhos para a realização do projeto podem surgir no recrutamento de voluntários para o experimento. Além disso, há o problema de obter um número de indivíduos, por grupo estudado, que estabeleça um resultado estatisticamente válido.

GRUPO 6

Parecerista: Nathália Vieira

Professor: Miguel Ortega

Projeto: Determinação e comparação da expressão gênica entre endométrios normais, hiperplásicos e com endometriose.

Proposta do projeto

O grupo pretende determinar e comparar o perfil da expressão gênica nos 3 grupos (mulheres com endométrios normais, hiperplásicos e com endometriose). Para isso, primeiramente as patologias nos grupos presentes serão confirmadas através de ultrasonografia transvaginal e depois será feito um teste de microarranjo comparando grupos patológicos com grupos normais para analisar a expressão gênica diferencial em cada situação. Posteriormente, será feito um sequenciamento automático para determinar se existe polimorfismo associado às patologias em estudo.

Relevância e Viabilidade

Esse projeto tem grande relevância uma vez que o padrão de expressão gênica proposto pode mostrar a relação entre a infertilidade com a endometriose e a hiperplasia, que ainda são incertas. Com esses resultados, será possível posteriormente melhorar as técnicas de diagnósticos e acompanhamento dessas patologias e até mesmo ter a possibilidade de um tratamento.

O trabalho em si é viável, porém o número de mulheres por grupo é muito pequeno, podendo resultar em dados equivocados ou não totalmente coerentes. Além disso seria importante comparar diretamente o perfil da expressão gênica entre as duas patologias e ainda outras técnicas com a de microsatélite poderia ser usada para simplificar o projeto.

GRUPO 7

Parecerista: Gabriel Fazito

Professor: Miguel Ortega

Projeto: Avaliação do efeito do tratamento com Kefir na microbiota e na expressão gênica das células epiteliais do intestino de camundongos.

Objetivo do projeto

- 1º) Avaliação do efeito do Kefir na microbiota e na expressão gênica de células epiteliais intestinais de camundongos;
- 2º) Quantificar comparativamente a microbiota do organismo com e sem Kefir;
- 3º) Analisar a expressão gênica nas células epiteliais intestinais durante o processo.

Relevância

Entender e compreender a influência real do organismo ao Kefir é importante, visto que seu uso tem sido distribuído amplamente por todo o mundo e uma análise transcricional dos seus impactos ao intestino e a microbiota é fundamental para melhor avaliar seu impacto à saúde humana.

Viabilidade

Projeto é viável, exceto talvez pelo cronograma que certamente será apertado pela quantidade enorme de experimentos a serem realizados.

GRUPO 8

Parecerista: Eudes Barbosa

Professor: Miguel Ortega

Projeto: Construção de bactérias verdes fluorescentes para uso didático

Objetivos do projeto

Esse estudo tem como objetivo a construção de uma linhagem de *Escherichia coli* fluorescente para uso didático e demonstração do processo de clonagem.

Relevância

O projeto seria relevante para melhorar a didática de ensino do processo de conjugação bacteriana em aulas práticas nas escolas de ensino médio. Bactérias fluorescentes poderiam tornar as aulas mais interativas e interessantes, conseqüentemente melhorando o aprendizado dos alunos.

Viabilidade

O projeto é altamente viável. Seria recomendável apenas optar por metodologias mais atuais de preparação de vetores. Além disso, deveria ser elaborado um programa para estimular escolas a adotarem as bactérias fluorescentes para uso em aulas praticas.