

**REALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), por meio da Escola de Ciências da Saúde e Vida.

Parceiros



## Comissão Organizadora

---

**Dr. Leandro Vieira Astarita.**

**Dra. Florencia Barbé-Tuana.**

**Dra. Géssica L Antunes**

**Dra. Fernanda Trindade**

**Me. Kétlin F Rodrigues**

**Me. Estevão Silveira Grams**

**Esp. Gabriel Nascimento**

## Apresentação

---

O III Simpósio de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS, que será realizado nos dias 17 e 18 de abril de 2023 no Auditório 202 do Prédio 40 visa abordar assuntos práticos e teóricos que fazem parte da vivência da pós-graduação. É um evento acadêmico voltado para o público de graduação e pós-graduação das áreas biológicas e biomédicas, que tratará de assuntos instigantes e inovadores. Neste evento, pretende-se também celebrar os 20 anos de atividade do PPGBCM, capacitando profissionais para atuarem com excelência.

## Objetivos

---

Promover a integração dos pesquisadores do PPGBCM com o público-alvo, discutindo as ferramentas moleculares e abordagens celulares para problemas relacionados a doenças humanas e meio ambiente.

## Convidados

---

### Cerimônia de Abertura:

---

Dr. Carlos Eduardo Lobo e Silva, Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação da PUCRS  
Dr. Luiz Gustavo Leão Fernandes, Diretor de Pós-Graduação  
Dra. Andrea Gonçalves Bandeira, Decana ECSV  
Dr. Cristiano Valim Bizarro, Coordenador PPGBCM  
Dr. Leandro Vieira Astarita e Dra. Florencia Barbé-Tuana, Comissão Coordenadora.

### Mesa redonda 1: Perspectivas da Pós-Graduação no Brasil e cenário da área Ciências Biológicas I

---

Dra. Célia Maria de Almeida Soares  
Dr. Valdir de Queiroz Balbino  
Mediador: Dr. Luiz Gustavo Fernandes

### Palestra 1: Divulgação científica nas redes sociais.

---

Dra. Mellanie Fontes Dutra (UNISINOS)

### Palestra 2: Neuroimunologia do crack: papel do estresse precoce.

---

Dr. Moisés Evandro Bauer (PUCRS)

### Novos Professores: Egressos do PPG-BCM

---

Dr. Luis Fernando S. Macedo Timmers (UNIVATES) - De códigos genéticos à proteínas em 3D: como a bioinformática pode ser aplicada nas áreas da saúde e ambiente.  
Dra. Ana Paula Duarte Souza (PUCRS) - O papel dos ácidos graxos de cadeia curta durante infecções respiratórias virais.  
Dr. Fernando Diz (PUCRS) - Nanomedicina e Câncer: passado, presente e futuro.

### Mesa Redonda 2: Microbiologia

---

Mariana Leyser  
Ms. Estevão S. Grams  
Ariel Moura Maia  
Mediadora Dra. Renata Medina da Silva.

### Palestra 3: Biologia Tecidual: De Michelangelo aos Voxels

---

Dr. Léder Xavier (PUCRS)

### Flash Talks: Jovens Doutores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

---

Dra. Fernanda Trindade  
Dra. Thamiris Becker Scheffel  
Dra. Rafaela Mendonça Nozari

### Mesa Redonda 3: Vida na Pós-Graduação

---

Dra. Géssica Luana Antunes  
Ms. Mailton Prestes Madruga  
Dra. Talita Pereira  
Mediador Dr. Thiago Wendt Viola

<b>SÚMARIO</b>	
INATIVAÇÃO DE SARS-COV-2 IN VITRO POR DMSO .....	7
ANÁLISE FUNCIONAL DE NOVAS MICROPROTEÍNAS INTRINSECAMENTE DESORDENADAS EM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS .....	9
CÉLULAS SENESCENTES E DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE OBESIDADE APRESENTAM SINALIZAÇÃO REDUZIDA DA VIA cGAS-STING.....	11
POTENCIAL DE PRECIPITAÇÃO E DISSOLUÇÃO DE CARBONATOS POR MICRORGANISMOS DE LAGOAS COSTEIRAS DO RIO GRANDE DO SUL.....	13
MICROSCOPIA: UM ESTUDO SOBRE TRANSPOSIÇÃO DIDÁTICA.....	18
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNE DAS PORÇÕES N- E C- TERMINAIS DE UMA PROTEÍNA RICA EM GLICINAS SALIVAR DO CARRAPATO <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	22
GENÔMICA DA HIBRIDAÇÃO ENTRE <i>LEOPARDUS GUTTULUS</i> E <i>LEOPARDUS GEOFFROYI</i> .....	23
IDENTIFICAÇÃO DE MICROPROTEÍNAS CODIFICADAS POR <i>smORFs</i> EXPRESSAS EM UM MODELO DE INFECÇÃO <i>in vitro</i> DE SARS-CoV-2 POR MEIO DE ANÁLISE PROTEOMICA.....	25
SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUBERCULAR DE 4-AMINO-N-(4-BENZOILOXIBENZIL) QUINOLINAS.....	27
ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ISOLADOS BACTERIANOS DO AQUÍFERO GUARANI SUBMETIDOS AO SELÊNIO .....	28
LOSARTAN E MALEATO DE ENALAPRIL MODULAM DE FORMAS DIFERENTES A RESPOSTA DE CÉLULAS VERO FRENTE A INFECÇÃO COM SARS-CoV-2 .....	32
INDUÇÃO DO FENÓTIPO SENESCENTE EM CÉLULAS-TRONCO ADIPO-DERIVADAS EXPOSTAS AO AMBIENTE CARACTERÍSTICO DA OBESIDADE.....	33
COMUNIDADES MICROBIANAS DE UMA TURFEIRA DA RPPN PRÓ-MATA.....	35
EOTAXINA-1/ CCL11 PROMOVE SENESCÊNCIA CELULAR EM FIBROBLASTOS PULMONARES VIA MECANISMOS PRÓ-OXIDANTES, PRÓ-INFLAMATÓRIOS E DE RESPOSTA DE DANO AO DNA .....	37
AVALIAÇÃO DA ADENOSINA E DA INOSINA NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE ESÔFAGO .....	38
PRODUÇÃO DE DANO AO DNA FRENTE ESTÍMULO COM CCL11 É MEDIADO POR ESTRESSE OXIDATIVO .....	40
PSEUDOCCELL: UMA NOVA FERRAMENTA PARA A SIMULAÇÃO DE DINÂMICAS MOLECULARES EM SISTEMAS CELULARES .....	42
ENVOLVIMENTO DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 NA MORTE INDUZIDA POR TRAIL e CURCUMINA EM CÂNCER DE BEXIGA.....	44
AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA DI-HIDRONEOPTERINA ALDOLASE (EC 4.1.2.25) DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> POR NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE.....	45
AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ESTRELADAS IMORTALIZADAS (GRX) .....	46
AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS ECTONUCLEOTIDASES EM NEOPLASIA DE ESÔFAGO .....	48
AVALIAÇÃO DA ADENOSINA E DA INOSINA NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE ESÔFAGO .....	49
EFEITOS DA SOBRECARGA DE FERRO E DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE OS NÍVEIS DE LIPOCALINA-2 EM HIPOCAMPO DE RATOS: UM ESTUDO EXPLORATÓRIO .....	51

## **RESUMOS EXPANDIDOS**

## INATIVAÇÃO DE SARS-COV-2 IN VITRO POR DMSO

**Ariel Moura Maia<sup>1,2</sup>, Laura Calle González<sup>1,2</sup>, Pablo Machado<sup>1,2</sup>, Luiz Augusto Basso<sup>1,2</sup>, Cristiano Valim Bizarro<sup>1,2\*</sup>**

*1Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil;*

*2Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90616-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;*

### INTRODUÇÃO

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto muito utilizado como solvente e que já foi reportado possuir propriedades antivirais mesmo em concentrações baixas, sendo inclusive utilizado em formulações antivirais tópicas (AGUILAR et al., 2002). Seu uso contra o SARS-CoV-2 já foi considerado no contexto clínico, mas seu potencial até agora foi pouco explorado na pesquisa in vitro (HOANG; HOANG; HAN, 2020).

### OBJETIVOS

Aferir o potencial de altas concentrações de DMSO em inativar amostras de células infectadas por SARS-CoV-2.

### MÉTODOS

Todos os experimentos de propagação viral e infecção/inativação foram conduzidos em laboratório de biossegurança nível 3 (NB3).

Em resumo, as células Vero E6 foram semeadas em placas de 24 poços (90.000 células/poço) e incubadas por 24 horas. O meio foi então removido e as células foram inoculadas com 200 µL de estoque viral a um MOI de 0.1. Controles negativos e positivos de infecção foram feitos em duplicata. Após 1 hora de adsorção o inóculo foi removido, 500 µL de meio de cultura suplementado com 2% de FBS foi adicionado e as células foram incubadas por 24 horas.

Após 24 horas de infecção, o meio foi aspirado e as células infectadas foram tratadas em triplicatas com 1 mL DMSO em diferentes concentrações (100%, 90%, 70% e 50%) por 15, 30 ou 45 minutos. Uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi usada para diluir o DMSO nas concentrações desejadas. Os controles negativos e positivos foram tratados com PBS.

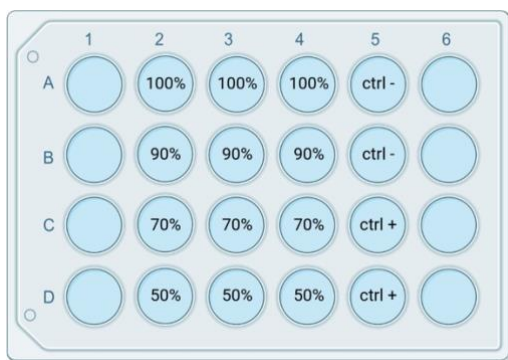
No final do tempo de incubação, o tratamento foi removido e 1 mL de PBS foi adicionado em cada poço para interromper o efeito do DMSO. As células foram raspadas usando uma ponta de pipeta de 1000 µL, a suspensão resultante foi transferida para um eppendorf de 1,5 mL, centrifugada por 5 minutos a 2500 x g e o sobrenadante foi removido. Os pellets de células foram lavados mais uma vez com 1 mL de PBS para remover o DMSO residual e centrifugados novamente, sendo então ressuspensos em 300 µL de PBS.

Para quantificar a presença de partículas virais viáveis remanescentes após estes tratamentos, foi utilizado o ensaio de placa (MENDOZA et al., 2020). Em suma, células Vero E6 foram semeadas em placas de 24 poços (90.000 células/poço) e incubadas por 24 horas. O meio foi removido e as células foram infectadas com 200 µL de cada suspensão celular, em triplicatas técnicas, durante 1 hora sem agitação. Após o tempo de adsorção, o inóculo foi removido e substituído por 1 mL de uma solução 1:1 de 2 x meio de cultura e 2 x solução de carboximetilcelulose (CMC) até uma concentração final de 0,5% de CMC, também suplementada com 2% de FBS, e a placa foi incubada por 3 dias. As amostras das duplicatas de controles negativo e positivo foram usadas como controles do ensaio de placa. Após os 3 dias de incubação, o meio foi descartado, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 40 minutos e coradas com solução aquosa de cristal violeta a 1% por 20 minutos. O excesso de cristal violeta foi lavado com água e a presença/ausência de placas foi aferida.

### RESULTADOS

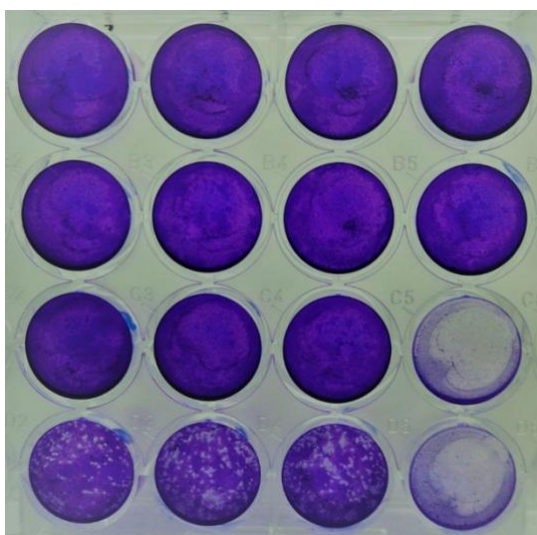
O DMSO em concentrações de 100%, 90% e 70% foi suficiente para inativar o SARS-CoV-2 em todos os tempos testados. Já na concentração de 50%, o tratamento reduziu a carga viral de forma diretamente proporcional ao tempo de incubação com a solução, ao comparar com o controle de infecção, mas não foi o suficiente para inativar o vírus por completo, mesmo no maior tempo testado (45 minutos). O desenho da placa e uma foto representativa do resultado se encontram abaixo.

Figura 1 - Ilustração do desenho experimental da placa.



Fonte: Elaborado pelo autor no BioRender, 2022.

Figura 2 - Foto representativa do ensaio de placa. A quantificação viral das amostras tratadas com 100%, 90% e 70% de DMSO mostram uma monocamada íntegra, enquanto os poços com a amostra tratada a 50% mostram efeito citopático. O desenho dessa placa é representado na figura 1.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022

### **CONCLUSÕES**

Em resumo, nas condições descritas o DMSO foi eficaz em inativar o SARS-CoV-2 em amostras infectadas quando estas foram tratadas por pelo menos 15 minutos com concentrações de DMSO acima de 70%, enquanto a concentração de 50% testada reduziu a carga viral, mas não foi o suficiente para inativar completamente o vírus em incubações menores que 45 minutos.

### **APOIO FINANCEIRO**

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Palavras-chave: SARS-CoV-2; COVID-19; DMSO; Inativação; MTT



## REFERÊNCIAS

- AGUILAR, J S et al. Dimethyl sulfoxide blocks herpes simplex virus-1 productive infection in vitro acting at different stages with positive cooperativity. Application of micro-array analysis. *BMC Infectious Diseases*, v. 2, p. 9, 24 May 2002.
- HOANG, Ba X; HOANG, Huy Q; HAN, Bo. Zinc iodide in combination with Dimethyl Sulfoxide for treatment of SARS-CoV-2 and other viral infections. *Medical Hypotheses*, v. 143, p. 109866, Oct. 2020.
- MENDOZA, Emelissa J et al. Two Detailed Plaque Assay Protocols for the Quantification of Infectious SARS-CoV-2. *Current protocols in microbiology*, v. 57, n. 1, p. ecpmc105, Jun. 2020.

## ANÁLISE FUNCIONAL DE NOVAS MICROPROTEÍNAS INTRINSECAMENTE DESORDENADAS EM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

**Adriana C. Miranda<sup>1,2,3</sup>, Eduardo V. de Souza<sup>1,2</sup>, Rafael A. Caceres<sup>3</sup>, Cristiano V. Bizarro<sup>1,2</sup>**

*Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil*

*Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90616-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

*Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

### INTRODUÇÃO

Atualmente, a tuberculose (TB) é uma infecção contagiosa crônica e a segunda principal causa de morte por um único agente infeccioso, ficando logo depois da COVID-19. Esta doença teve 10,6 milhões de infectados doentes e 1,6 milhões de mortes em 2021, superando HIV/AIDS (Global Tuberculosis Report WHO, 2022). Esta doença é causada pelo agente infeccioso *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), também conhecido como bacilo de Koch. Existe uma variedade de tratamentos com diversos mecanismos de ação para a doença ativa de TB mas, concomitantemente, Mtb foi desenvolvendo vários mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos e então, diversos grupos de cepas resistentes. Hoje em dia, o repertório de alvos moleculares utilizados para tratamentos de diversas doenças é muito limitado e ainda mais quando se fala em antibióticos (Overington et al. 2006), por isso há uma demanda na detecção de novos alvos com novos mecanismos de ação. Também, há outros desafios relacionados à TB como o desenvolvimento de vacinas e o próprio diagnóstico, além do próprio combate às cepas multirresistentes. Para isso, existem diversas abordagens sendo utilizadas desde a nanotecnologia até a própria bioinformática, a qual nos permite, por exemplo, o planejamento de fármacos in silico. A genômica e metabolômica tem se mostrado muito importantes nesta situação, permitindo também, a análise dos papéis e expressão diferencial de diversas proteínas ou até mesmo, o envolvimento de diferentes sensores em relação à resistência. Deste modo, a proteogenômica é uma área que envolve a junção da transcriptômica, genômica e proteômica. Ela permite a criação de bancos de dados customizados através da análise simultânea de predições in silico e dados experimentais de espectrometria de massas, por exemplo. Por outro lado, os processos de anotação de genomas geralmente excluem as fases de leitura abertas menores de 100 códons (smORFs) a fim de excluir sequências não codificadoras, mas estudos recentes têm mostrado que as microproteínas codificadas a partir destas smORFs possuem funções biológicas importantes, havendo, então, um “proteoma oculto”. Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido uma pipeline,  $\mu$ ProtInS (De Souza et al. 2022), cuja aplicabilidade foi utilizada para a detecção proteogenômica de smORFs em Mtb. Estes dados ainda não foram publicados. Todavia, devido à cadeia curta de aminoácidos das microproteínas, elas têm uma tendência a apresentarem domínios de desordem intrínseca, podendo ser então proteínas intrinsecamente desordenadas (IDPs). Devido à flexibilidade das IDPs, existem muitas possibilidades funcionais como a associação à diversos ligantes estruturalmente diferentes (Mishra et al. 2020) permitindo agirem como hubs de interação mas também participarem em doenças tais como a  $\beta$ -amilóide na doença de Alzheimer (Burger et al. 2014), a  $\alpha$ -sinucleína na doença de Parkinson (Conway et al. 2000) e a própria p53 no câncer (Braithwaite et al. 2006). Devido a essa diversidade de possibilidades biológicas e realções com doenças, as IDPs são fortes candidatas de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos (Ruan et al. 2019). Por fim, considerando a diversidade de funções biológicas das IDPs e as microproteínas não anotadas em Mtb, sua análise funcional pode fornecer dados que poderiam ser utilizados para eventuais alvos terapêuticos.

## **OBJETIVOS**

Caracterizar funcionalmente por meio de ferramentas computacionais microproteínas estruturalmente desordenadas de Mtb, como também o grau de desordem intrínseca e sua conservação em outras espécies.

## **MÉTODOS**

Foram obtidas as IDPs de todas as novas microproteínas de Mtb utilizando o InterPro, e sua estrutura foi analisada utilizando o AlphaFold2 e outros preditores como FoldIndex e IUPred2A, entre outros. A análise filogenética foi feita utilizando o Orthofinder. Também foi realizada uma análise do contexto genômico e localização celular.

## **RESULTADOS**

Obtivemos 32 novas IDPs com 382 homologas e 90 ortólogas em outras espécies. Encontramos até oito grupos funcionais de genes relacionados às smORFs com diferentes predições de localização celular e predições de estrutura secundária. Houve uma pequena diversidade de predições de grau de desordem intrínseca com os diferentes preditores devido às diferentes abordagens mas mais de cinco IDPs apresentaram resultados promissores para análises futuras.

## **CONCLUSÕES**

Encontramos várias IDPs que podem ser boas candidatas para o melhor entendimento do funcionamento biológico de Mtb e, eventualmente, ajudar a combater as cepas resistentes.

## **APOIO FINANCEIRO**

Os custos para a elaboração deste estudo foram de responsabilidade da autora. O trabalho foi desenvolvido com um equipamento que já se encontra como patrimônio da instituição pois foi adquirido mediante os projetos 421703-2017-2/17-1265-8/14.2.0914.1 do INCT-TB.

## **PALAVRAS-CHAVE**

smORFs, desordem intrínseca, Mycobacterium tuberculosis, proteogenômica

## **REFERÊNCIAS**

- BURGER, Virginia; GURRY, Thomas ; STULTZ, Collin. Intrinsically Disordered Proteins: Where Computation Meets Experiment. *Polymers*, v. 6, n. 10, p. 2684– 2719, 2014. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4360/6/10/2684>>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- BRAITHWAITE, A W; DEL SAL, G ; LU, X. Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell Death & Differentiation*, v. 13, n. 6, p. 984–993, 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/4401924>>. Acesso em: 9 dez. 2022.
- CONWAY, Kelly A.; LEE, Seung-Jae; ROCHET, Jean-Christophe; et al. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both  $\alpha$ -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 2, p. 571–576, 2000. Disponível em: <<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.97.2.571>>. Acesso em: 9 dez. 2022.
- DE SOUZA, Eduardo Vieira; DALBERTO, Pedro Ferrari; MACHADO, Vinicius Pellisoli; et al.  $\mu$ Protelns—a proteogenomics pipeline for finding novel bacterial microproteins encoded by small ORFs. *Bioinformatics*, v. 38, n. 9, p. 2612–2614, 2022. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-abstract/38/9/2612/6533442>>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- Global Tuberculosis Report 2022. Who.int. Disponível em: <<https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>>. Acesso em: 11 dez. 2022.
- OVERINGTON, John P.; AL-LAZIKANI, Bissan ; HOPKINS, Andrew L. How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, n. 12, p. 993–996, 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrd2199>>. Acesso em: 16 Jan. 2022.
- MISHRA, Pushpendra Mani; VERMA, Navneet Chandra; RAO, Chethana; et al. Intrinsically disordered proteins of viruses: Involvement in the mechanism of cell regulation and pathogenesis. *Dancing Protein Clouds: Intrinsically Disordered Proteins in Health and Disease, Part B*, p. 1–78, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117320300363>>. Acesso em: 16 Jan. 2022.
- RUAN, Hao; SUN, Qi; ZHANG, Weilin; et al. Targeting intrinsically disordered proteins at the edge of chaos. *Drug Discovery Today*, v. 24, n. 1, p. 217–227, 2019. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359644618300448>>. Acesso em: 9 dez. 2022.

## **CÉLULAS SENESCENTES E DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE OBESIDADE APRESENTAM SINALIZAÇÃO REDUZIDA DA VIA cGAS-STING**

**SCHMITZ, Carine R R<sup>1</sup>; GRUN, Lucas K<sup>3</sup>; MAKIYAMA, Bruno K<sup>2</sup>; PIAZZA, Luma S<sup>2</sup>; FOGAÇA, Marcela<sup>2</sup>, BAUER, Moisés E<sup>2,5</sup>, GUMA, Fatima T R<sup>1</sup>, BARBÉ-TUANA, Florencia M<sup>2,3</sup>.**

*1 Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil,*

*2 Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil,*

*3 Programa de Pós-graduação em Pediatria e Saúde da Criança, Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil*

*4 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Neuroimunomodulação (INCT-NIM),*

*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, Brasil,*

*5 Programa de Pós-graduação em Gerontologia Biomédica, Escola de Medicina,*

*Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil*

### **INTRODUÇÃO**

A senescência celular é um fenótipo presente no envelhecimento caracterizado por instabilidade genômica e um microambiente pró inflamatório (FULOP e colab., 2010). O aumento de células senescentes é regulado por células do sistema imune responsáveis pelo reconhecimento, eliminação e regeneração dos tecidos que quando senescentes, não desempenham corretamente sua função contribuindo para a perpetuação do fenótipo senescente levando a progressão do dano e disfunção tecidual (MITTELBRUNN e KROEMER, 2021; RAPOZO e colab., 2021). A via do estimulador de genes de interferon (STING) induzida pelo segundo mensageiro guanosina monofosfato (GMP) - adenosina monofosfato (AMP) (2'3'-cGAMP) produzido pela estimulação da enzima GMP-AMP sintase cíclica (cGAS) está presente na resposta imune inata. A cGAS reconhece e responde frente a fragmentos de DNA de fita dupla presentes no citosol (dsDNA) e ativa as cascatas de sinalização do fator nuclear Kappa B (NF-κB) e de interferons (INF) via o fator regulador de interferon 3 (IRF3) (LI e CHEN, 2018).

### **OBJETIVOS**

Avaliar a via cGAS-STING em macrófagos derivados de monócitos (MDM) e linfócitos T de sangue periférico senescentes como possível novo biomarcador de senescência. Métodos: Nesse trabalho analisamos diversos marcadores de senescência celular descritos classicamente em fibroblastos e a capacidade de resposta da proteína STING frente ao estímulo de 2'3'-cGAMP. Culturas primárias de monócitos e linfócitos T de sangue periférico foram mantidas em meio suplementado com soro humano autólogo (SHA, 10%) e estímulo mitógeno por até 30 dias em incubadora úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Também utilizamos células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos portadores de obesidade extrema (IMC ≥ 35 kg/m<sup>2</sup>) como modelo de envelhecimento prematuro. O tamanho de área celular e nuclear foram obtidos por imagem em microscópio óptico. As proteínas de interesse foram analisadas por imunofluorescência e citometria de fluxo. O comprimento relativo dos telômeros foi quantificado por qPCR como razão (T/S). A fagocitose de partículas E. coli fluorescentes e o dsDNA citosólico foram analisadas por imagens obtidas em microscopia confocal e por contraste de interferência diferencial (DIC). A secreção de citocinas foi analisada no sobrenadante das culturas primárias por citometria de fluxo. O projeto foi aprovado pelo CEP da UFRGS e da PUCRS (CAAE: 38440220.7.3001.5347 e CAAE: 38440220.7.0000.5336, respectivamente).

### **RESULTADOS**

Observamos aumento de área celular ( $P < 0,0001$ ) e nuclear ( $P = 0,0005$ ) em MDM envelhecidos em cultura. Também observamos aumento da expressão de P16 ( $P = 0,0217$ ), γH2AX ( $P = 0,0093$ ), diminuição da proteína LAMINA B1 ( $P < 0,0001$ ) e presença aumentada de dsDNA no citosol ( $P = 0,0079$ ). Observamos redução do comprimento dos telômeros ( $P = 0,0027$ ) e redução da fagocitose ( $P < 0,0001$ ). Juntos, estes resultados são condizente com células senescentes (RAPOZO e colab., 2021). Finalmente observamos uma redução significativa de STING ( $P = 0,0021$ ), da expressão de p-P65 ( $P = 0,0006$ ), e da secreção das citocinas pró inflamatórias IL-6

( $P=0,0049$ ) e IL-1 $\beta$  ( $P=0,0267$ ). Também observamos uma redução na sinalização da via STING com redução do limiar de estimulação por 2'3'-cGAMP na produção de citocinas (IL-8, IL-6, TNF, INF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ). Resultados semelhantes foram encontrados em monócitos de portadores de obesidade. Aumento de  $\gamma$ H2AX ( $P=0,0296$ ), aumento de P16 ( $P=0,0006$ ), redução de STING ( $P=0,0068$ ), redução de p-p65 ( $P=0,0021$ ) e redução da secreção de citocinas após 24h de cultura, IL-8 ( $P=0,0015$ ), IL-6 ( $P=0,0084$ ) e TNF ( $P=0,0023$ ). Monócitos de indivíduos portadores de obesidade, quando estimulados por 2'3'-cGAMP também não demonstraram capacidade de elevar a secreção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF, INF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . Em linfócitos T envelhecidos observamos redução da proteína CD27 ( $P=0,0361$ ), aumento de P16 ( $P=0,0491$ ), aumento de  $\gamma$ H2AX ( $P=0,0175$ ) e redução de LAMINA B1 ( $P=0,0040$ ). Interessantemente, observamos uma significativa redução de STING ( $P=0,0217$ ) e da secreção de INF- $\gamma$  ( $P=0,0013$ ) nas células senescentes. Linfócitos T envelhecidos ainda não demonstraram capacidade de elevar a secreção de estimulação de INF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  frente ao estímulo de 2'3'-cGAMP. Linfócitos T purificados a partir de indivíduos portadores de obesidade apresentaram padrões semelhantes aos envelhecidos em cultura com aumento da proteína P16 ( $P=0,0296$ ) e diminuição de STING ( $P<0,0001$ ), pP65 ( $P<0,0001$ ) e da secreção de IL-8 ( $P=0,0282$ ) e TNF ( $P=0,0306$ ). A diminuição do limiar de estimulação frente ao estímulo de 2'3'-cGAMP também foi observada para a secreção das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, INF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ .

### CONCLUSÕES

Os resultados apresentados caracterizam linfócitos T e monócitos senescentes (MITTELBRUNN e KROEMER, 2021). Ainda salientamos a resistência na via de ativação de STING quando estimulada, a qual pode impactar na secreção de citocinas importantes para o funcionamento adequado da resposta imune (GUTJAHR e colab., 2019; LEE e colab., 2022; MATHAVARAJAH e colab., 2019; YANG e colab., 2022). Assim, apontamos a via cGAS-STING como um potencial novo biomarcador de senescência em células mononucleares.

### APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brasil (CAPES).

### PALAVRAS-CHAVE

envelhecimento, inflamação, senescência, imunossenescência, cGAMP

### REFERENCIAS

- FULOP, T. e colab. Aging, frailty and age-related diseases. *Biogerontology*, v. 11, n. 5, p. 547–563, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20559726/>>
- GUTJAHR, Alice e colab. The STING ligand cGAMP potentiates the efficacy of vaccine-induced CD8+ T cells. *JCI Insight*, v. 4, n. 7, p. e125107, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30944257/>>
- LEE, Je Jung e colab. STING mediates nuclear PD-L1 targeting-induced senescence in cancer cells. *Cell Death and Disease*, v. 13, n. 9, p. 791, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36109513/>>
- LI, Tuo e CHEN, Zhijian J. The cGAS-cGAMP-STING pathway connects DNA damage to inflammation, senescence, and cancer. *J. Exp. Med*, v. 215, n. 5, p. 1287–1299, 2018. Disponível em: <<http://doi.org/10.1084/jem.20180139>>.
- MATHAVARAJAH, Sabateeshan e SALSAMAN, Jayme e DELLAIRE, Graham. An emerging role for calcium signalling in innate and autoimmunity via the cGAS-STING axis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. v. 50, p. 43-51, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30955997/>>
- MITTELBRUNN, Maria e KROEMER, Guido. Hallmarks of T cell aging. *Nature Immunology*, v. 22, n. 6, p. 687–698, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41590-021-00927-z>>.
- RAPOZO, Gabriela e colab. Hallmarks of Aging in Macrophages: Consequences to. *Cells*, v. 10, n. 6, p. 1323, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34073434/>>
- YANG, Yuting e HUANG, Yiming e ZENG, Zhenguo. Advances in cGAS-STING Signaling Pathway and Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 1–19, 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.800393/full>>

## POTENCIAL DE PRECIPITAÇÃO E DISSOLUÇÃO DE CARBONATOS POR MICRORGANISMOS DE LAGOAS COSTEIRAS DO RIO GRANDE DO SUL

Caroline Zilio Lopes<sup>1,2</sup> e Renata Medina da Silva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup>Grupo de Geobiologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

### INTRODUÇÃO

A carbonatogênese, ou o processo de formação de carbonatos, pode ocorrer em diversos ambientes como resultado de interações físico-químicas abióticas e por meio de processos biológicos associados. Estes processos ocorrem a partir de modificações celulares, fisiológicas e moleculares em microrganismos, além da capacidade destes em utilizar vias metabólicas distintas — as quais favorecem a precipitação e dissolução destes minerais, além de outros processos, tornando-os importantes em ciclos biogeoquímicos do planeta, como no ciclo do carbono (Castro-Alonso et al. 2019). Através da utilização de enzimas específicas, como a Anidrase Carbônica (AC), os microrganismos possuem a habilidade de fazer a interconversão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e íons bicarbonato, por exemplo, atuando na captação de CO<sub>2</sub> durante o processo de formação de minerais. Esta captura, porém, também pode ocorrer através de processos de dissolução realizados pela AC (Abdelsamad et al. 2022). Ainda, outras interações microbianas ocorrem e favorecem os processos envolvidos durante a biomineralização de carbonatos, como a comunicação do tipo Quorum Sensing (QS), a partir da produção, liberação, acúmulo e/ou detecção de moléculas auto-indutoras (AIs), importantes para a troca de informações e direcionamento da expressão de determinados genes (Mukherjee et al. 2019). Portanto, o estudo dos processos envolvidos na formação de carbonatos por microrganismos deve ser explorado, uma vez que possui potencial em ser utilizado como ferramenta de mitigação ou controle de gases de efeito estufa (Greenhouse Gases ou GHGs) liberados por meio de atividades antrópicas. Ainda neste sentido, ambientes contendo espécies com habilidades pouco estudadas no contexto da biomineralização podem fornecer insights para o desenvolvimento de novas estratégias, além de conhecimento acerca do tema.

### OBJETIVO

Avaliar a capacidade de precipitação e dissolução de carbonatos de cálcio e magnésio por comunidades microbianas e isolados obtidos destas, a partir de amostras de lagoas costeiras do estado do Rio Grande do Sul (RS).

### MATERIAIS E MÉTODOS

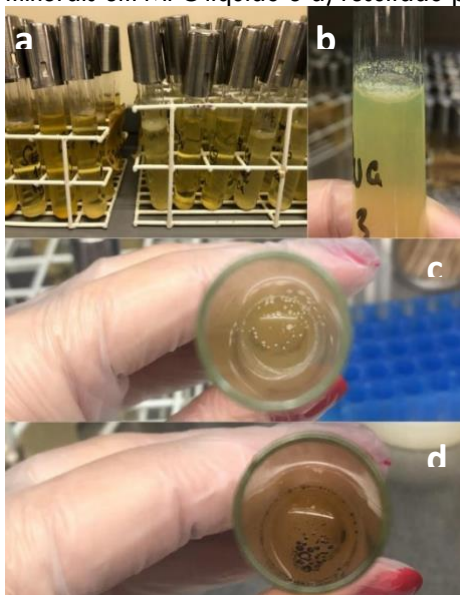
Em outubro de 2022, amostras de água de sub-superfície de 14 lagoas costeiras do Rio Grande do Sul (RS), pré-selecionadas de acordo com gradientes tróficos mensurados anteriormente (Bohnenberger et al. 2018, Rocha et al. 2020), foram coletadas em três pontos distintos (centro, borda Leste e borda Oeste) e utilizadas em testes para avaliação da capacidade de precipitação e dissolução de carbonatos (cálcio e magnésio) pelas comunidades microbianas presentes nas amostras, assim como pelos isolados microbianos obtidos a partir destas. Para tal, o meio de cultura MPC (Meio de Precipitação de Carbonatos) composto de 10 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de proteose-peptona, 1 g/L de glicose e 4 g/L de acetato de cálcio ou acetato de magnésio, suplementado com solução de sais composta de 26.5 g/L de NaCl, 2.44 g/L de MgCl<sub>2</sub>, 3.3 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 1.14 g/L de CaCl<sub>2</sub>, 0.725 g/L de KCl, 0.2 g/L de NaHCO<sub>3</sub> e 0.083 g/L de NaBr e com pH ajustado para 7.2 (Rivadeneira et al. 1993) foi utilizado, em condição sólida e líquida. Adicionalmente, o meio líquido foi também preparado a partir da substituição de solução de sais artificial por água das próprias lagoas (a partir da mistura de água de todos os pontos de cada respectiva lagoa filtrada com membrana de 5 µm), para o aporte de sais e microrganismos procariontes. Para avaliação da capacidade de dissolução de carbonatos, os meios DBC (Deveze-Bruni's cálcio) e DBM (Deveze-Bruni's magnésio) foram utilizados (Orhan et al. 2017). Estes meios são compostos, respectivamente, por 20 g/L de glicose, 10g/L de NaCl, 3g/L de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 g/L de MgSO<sub>4</sub>, 0,4 g/L de KCl, 0,2 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 g/L de ágar e 15 g/L de CaCO<sub>3</sub> ou MgCO<sub>3</sub> (Orhan et al. 2017). Todos os cultivos, tanto em MPC, quanto em DBC e DBM, foram mantidos em estufa à 25°C por 30 dias ou até a observação de minerais formados (no caso do MPC) ou aparecimento de halo de dissolução (Deveze-Bruni's). Os minerais formados em MPC foram isolados dos biofilmes e analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e, eventualmente, Espectroscopia de Raio-X por Energia Dispersiva (Energy-dispersive X-ray Spectroscopy

ou EDS). Adicionalmente, em tubos de vidro estéreis, 10 mL da água de cada lagoa será também mantida em estufa à 25°C durante quatro meses, para observação da formação de biofilmes e minerais de forma não induzida. Além disso, os isolados microbianos analisados anteriormente serão taxonomicamente identificados.

### RESULTADOS

Como resultados, foram obtidos 14 isolados a partir das amostras de água de 14 lagoas coletadas, os quais tiveram DNA extraído e o gene 16S ribossomal amplificado através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os cultivos em MPC líquido de comunidades e isolados apresentaram crescimento e foram capazes de formar filmes sobre o meio, indicando capacidade metabólica para tal. Destes, 28 comunidades microbianas de pontos distintos das lagoas foram capazes de precipitar minerais em MPC líquido de cálcio (de formulação “original”) (Figura 1) e apenas uma em MPC sólido, uma vez que foi observada a presença de larvas de insetos que influenciaram no resultado das análises. Ainda em relação às comunidades, 10 destas foram capazes de precipitar minerais em MPC líquido de cálcio substituído com água das lagoas, oito destas, oriundas de pontos distintos das lagoas, foram capazes de precipitar minerais em MPC líquido de magnésio (de formulação “original”) e duas em MPC sólido. Além disso, duas comunidades foram capazes de precipitar minerais em MPC líquido de magnésio substituído com água das lagoas.

Figura 1: a) cultivos de comunidades em MPC líquido contendo cálcio ou magnésio e formulação original ou água das lagoas; b) resultado positivo de formação de minerais em MPC líquido, c) resultado positivo de formação de minerais em MPC líquido e d) resultado positivo de formação de minerais em MPC líquido.



Fonte: Os autores.

Dentre os isolados testados em MPC, oito foram capazes de precipitar minerais em MPC líquido contendo cálcio e 11 em MPC sólido. Em relação ao magnésio, três isolados foram capazes de precipitar minerais em MPC líquido e dois em MPC sólido (Figura 2).

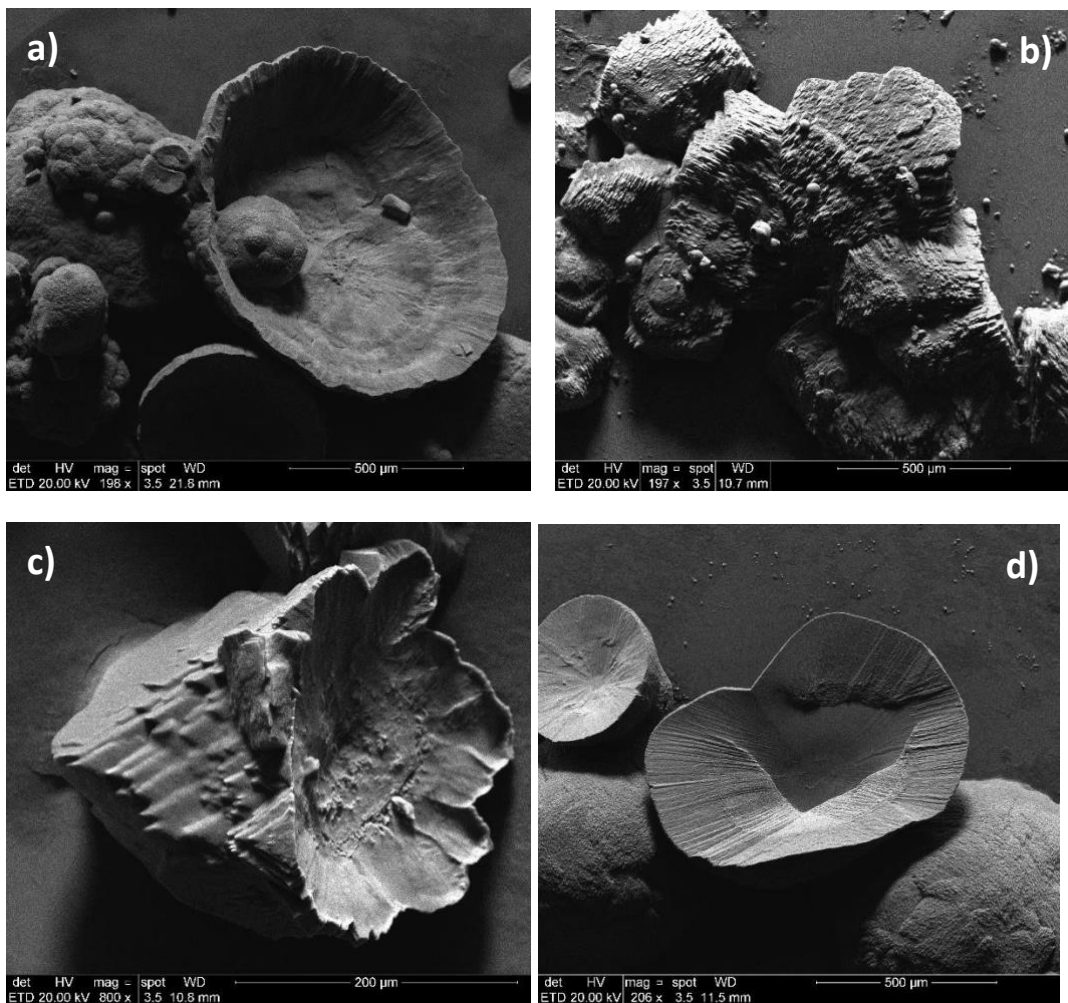
Figura 2: cultivos de comunidades em MPC sólido.



Fonte: Os autores.

Os minerais coletados a partir de resultados positivos em MPC foram analisados por MEV e EDS e apresentaram diferenças morfológicas quando comparadas entre comunidades e isolados oriundos desta mesma comunidade, e entre os minerais formados em MPC originalmente descrito ou substituído pela água das lagoas, bem como em condição sólida e líquida destas mesmas amostras (Figura 3).

Figura 3: minerais analisados por MEV, formados nas seguintes condições a) MPC cálcio líquido solução de sais (lagoa Horácio); b) MPC cálcio líquido água da lagoa (lagoa Horácio), c) MPC cálcio líquido solução de sais (lagoa Peixoto) e, d) MPC cálcio líquido água da lagoa (lagoa Peixoto).



Fonte: Os autores.

A partir dos resultados de dissolução, onde era esperada a observação de halo indicando habilidade da comunidade ou isolado em dissolver carbonatos, cinco comunidades apresentaram halo de dissolução em diferentes pontos coletados em DBC e apenas uma comunidade apresentou estes halos em DBM. Dentre os isolados, por outro lado, foi possível observar halo de dissolução em nove testes de DBC e em sete de DBM (Figuras 4 e 5).

Figura 4: cultivos em DBC, sendo representados resultados positivos de dissolução por isolado (lado esquerdo) e por comunidades de diferentes pontos de uma lagoa (lado direito).



Fonte: Os autores.

Figura 5: cultivos em DBM, sendo representados resultados negativos de dissolução por comunidades de diferentes pontos de uma lagoa (lado esquerdo) e positivo por isolado (lado direito).



Fonte: Os autores.

Por fim, apenas em um dos pontos (referente a borda Oeste) da lagoa Quadros foi possível observar resultados positivos de forma não induzida, até o presente momento. Contudo, esta mesma lagoa também apresentou resultados positivos nos testes realizados com MPC e meios DBC e DBM, portanto, demonstrando chances futuras de ser selecionada para novos experimentos do projeto.

### CONCLUSÃO

As lagoas costeiras coletadas, embora ainda pouco estudadas no contexto da biomineralização, apresentam espécies microbianas com tal capacidade — pelo menos em relação aos principais processos envolvidos na carbonatogênese — como precipitação e dissolução. Os minerais formados nos diferentes meios de cultura sugerem que ao menos parte das populações se mantem viável ao longo do processo de precipitação mineral, uma vez que após o período de 30 dias necessário para os testes em MPC líquido, ainda foi possível observar o seu crescimento em MPC sólido, mantendo resultados positivos para precipitação de carbonatos. Além disso, isolados obtidos a partir dos primeiros cultivos em MPC líquido inoculado com comunidades foram capazes de demonstrar precipitação em MPC líquido e sólido pelo mesmo tempo de incubação. Os minerais formados pelas comunidades microbianas em meio líquido apresentaram diferenças em relação aos minerais formados na condição sólida, o que pode ser explicado pela condição intrínseca do meio, mas também por interações entre espécies que estavam presentes e atuando nos diferentes cultivos. Além disso, os precipitados minerais formados a partir dos inóculos de isolados em MPC sólido ficaram menos tempo (23 dias) em relação aos cultivos líquidos que permaneceram pelos 30 dias completos, devido a presença de larvas na fase final. Estas podem ter influenciado diretamente no processo de precipitação, uma vez que foi observado que estas eram capazes de



se alimentar de colônias e minerais que já haviam sido formados, ao menos visivelmente, em meio sólido. Acreditamos que os ovos que deram origem as larvas já estivessem presentes nos cultivos líquidos, pois os inóculos realizados em MPC sólido foram realizados a partir dos inóculos em meio líquido. Contudo, estas só conseguiram se desenvolver a partir do sétimo dia de cultivo em meio sólido. Além disso, em relação aos minerais formados nas diferentes condições de meio, temos duas hipóteses principais: (I) se as mesmas espécies que atuaram em MPC líquido (30 dias) continuaram viáveis nos cultivos sólidos, estas devem ter, de fato, precipitado minerais diferentes a partir da condição do meio ou por interações entre os indivíduos da comunidade microbiana (além de demais interações do meio, como no caso das larvas). Contudo, (II) os mesmos microrganismos que precipitaram de forma “relevante” nos cultivos líquidos durante o processo de precipitação podem não estar mais viáveis, e, desta forma, outras espécies com capacidade de precipitar minerais podem ter realizado esta função em meio sólido, produzindo desta forma, minerais diferentes. De qualquer forma, as condições físicas do meio, além de interações entre espécies que estavam presentes nos inóculos pode ter influenciado nestas diferenças. De forma semelhante ao que foi discutido acima, as diferenças observadas entre a condição do meio foram também observadas e comparadas a partir dos isolados, os quais podem ter sido influenciados por populações de mesma espécie ao invés da comunidade como um todo. Este resultado pode ter sido unicamente influenciado por todos os fatores já citados, como diferentes condições físicas do meio e/ou interações entre comunidades, populações e/ou outras espécies. Porém, outra hipótese é que (I) o isolado pode ter precipitado de forma mais “relevante” na comunidade das lagoas (mesmo na “comunidade do MPC sólido”), contudo, devido a diferenças na condição do meio e na dinâmica dos indivíduos de uma única espécie (o que difere da dinâmica de toda a comunidade), precipitou minerais diferentes ou (II) o isolado pode não ter precipitado de forma tão “relevante” na comunidade, além de outras possíveis diferenças na condição do meio e na dinâmica dos indivíduos de uma única espécie. Todas estas discussões geram novas perguntas complexas em relação às interações que podem estar ocorrendo em um micro-ambiente simulado, e, portanto, sistemas experimentais de mesocosmo (adaptados a partir de cenários ambientais futuros previstos pela Intergovernmental Panel on Climate Change ou IPCC) serão utilizados futuramente neste projeto, a partir de novas amostras de água coletadas da lagoa, e em respectivo ponto, que apresentar os melhores resultados a partir dos testes realizados. Além disso, a partir da montagem deste sistema, análises de RNA-seq de transcritos relacionados com os metabolismos microbianos, utilização da enzima AC e moléculas de QS serão realizadas, assim como análises de metabarcoding, e dentre outras, as quais poderão fornecer pistas importantes sobre um dos mais importantes processos biogeoquímicos do planeta, envolvido no ciclo de nutrientes e na captação de CO<sub>2</sub> dos ambientes.

#### ***PALAVRAS-CHAVE***

carbonatos, biomineralização, biofilmes microbianos, lagoas.

#### ***APOIO FINANCEIRO***

Este projeto de doutorado conta com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil (CAPES).

#### ***REFERÊNCIAS***

- Abdelsamad, R., Disi, Z. A., Abu-Dieyeh, M., Al-Ghouti, M. A., & Zouari, N. (2022). Evidencing the role of carbonic anhydrase in the formation of carbonate minerals by bacterial strains isolated from extreme environments in Qatar. *Heliyon*, 8(10), E11151. doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.311151>.
- Bohnenberger, J. E., Schneck, F., Crossetti, L. O., Lima, M. S., & Motta-Marques, D. D. (2018). Taxonomic and functional nestedness patterns of phytoplankton communities among coastal shallow lakes in southern Brazil. *Journal of Plankton Research*. doi:10.1093/plankt/fby032
- Castro-Alonso, M. J., Montañez-Hernandez, L. E., Sanchez-Muñoz, M. A., Macias Franco, M. R., Narayanasamy, R., & Balagurusamy, N. (2019). Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) and Its Potential in Bioconcrete: Microbiological and Molecular Concepts. *Frontiers in Materials*, 6. doi:10.3389/fmats.2019.00126
- Moreno, H. D., Köring, M., Di Pane, J., Tremblay, N., Wiltshire, K. H., Boersma, M., & Meunier, C. L. (2022). An integrated multiple driver mesocosm experiment reveals the effect of global change on planktonic food web structure. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03105-5>
- Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*. doi:10.1038/s41579-019-0186-5
- Orhan, F., Demirci, A., & Yanmis, D. (2017). CaCO<sub>3</sub> and MgCO<sub>3</sub> Dissolving Halophilic Bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 34(9), 804–810. <https://doi.org/10.1080/01490451.2016.1273410>

Rivadeneira MA, Delgado R, Delgado G, Del Moral A, Ferrer MR, Ramos-Cormenzana, A. Precipitation of carbonates by *Bacillus* sp. isolated from saline soils. *Geomicrobiology Journal* 1993 Sep; 11(3–4): 175–184.

Rocha, C. M. D., Milani, G. B. & Zanona, Q. K. (2020). Monitoramento de qualidade de águas superficiais da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí: Relatório de dados brutos - Período 2018-2020. Disponível em: [www.bibliotecadigital.ufrgs.br/da.php?nrb=001122482&loc=2021&l=c8aec0871e98d7cb](http://www.bibliotecadigital.ufrgs.br/da.php?nrb=001122482&loc=2021&l=c8aec0871e98d7cb)

## **MICROSCOPIA: UM ESTUDO SOBRE TRANSPOSIÇÃO DIDÁTICA.**

**Gabriela Ribeiro Borges 1, Gabriel do Nascimento Soares 1 ; Mauricio Reis Bogo 1**

*Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil.*

### **INTRODUÇÃO**

O conceito de transposição didática foi proposto pelo sociólogo Michel Verret em 1975. Em 1982, Chevallard e Marie-Alberte Johsua resgataram o conceito e o difundiram na área de ensino de ciências e matemática (PINHO ALVES FILHO, 2001).

Segundo Pinho Alves Filho (2001), a transposição didática é uma ação no qual “um conteúdo do saber que foi designado como saber a ensinar sofre um conjunto de transformações adaptativas que vão torná-lo apto para ocupar um lugar entre os objetos de ensino. O trabalho que transforma um objeto do saber a ensinar em um o objeto de ensino é denominado transposição didática” (CHEVALLARD, 1991, p. 39). Devido essas transformações do saber sábio ao saber a ensinar e por esse ensinado. Esses saberes são altamente interligados ao meio escolar, pois a partir do saber sábio (realizado por cientistas) é transferido ao saber a ensinar (livros didáticos) e pôr fim ao saber a ensinado (aquele que é colocado em sala de aula). (POLIDORO; STIGAR, 2010).

Antes da invenção dos microscópios os primeiros biólogos iniciaram seus estudos abrindo-as juntamente com tecidos, cortando para investigar o seu conteúdo, o qual era confuso para os mesmos devido a capacidade visual do olho humano para observação intracelular/ extracelular e suas propriedades. No entanto esse foi o pontapé inicial para os estudos da Biologia Celular. O surgimento do microscópio surgiu no século XVII e por centenas de anos, tudo que foi descoberto no meio celular utilizando esse instrumento. (ALBERTS; BRAY; JONHSON, 2017). Baseando-se nisso, o objetivo desse trabalho foi analisar o conteúdo de Microscopia em livros didáticos da educação básica (saber a ensinar), comparando com um livro de ensino superior (saber sábio), com vistas a verificar possíveis distanciamentos entre estes saberes, bem como avaliar a fidedignidade das informações científicas presentes nos livros didáticos.

Palavras-Chave: Microscopia; Transposição Didática; Microscópio; Célula.

### **OBJETIVO**

Analisar a Transposição didática do conteúdo de microscopia.

### **METODOLOGIA**

Baseando-se na teoria da transposição didática de Chevallard (1991), foram analisados os livros descritos no Quadro 1. Na Figura 1 estão as capas dos livros didáticos analisados.

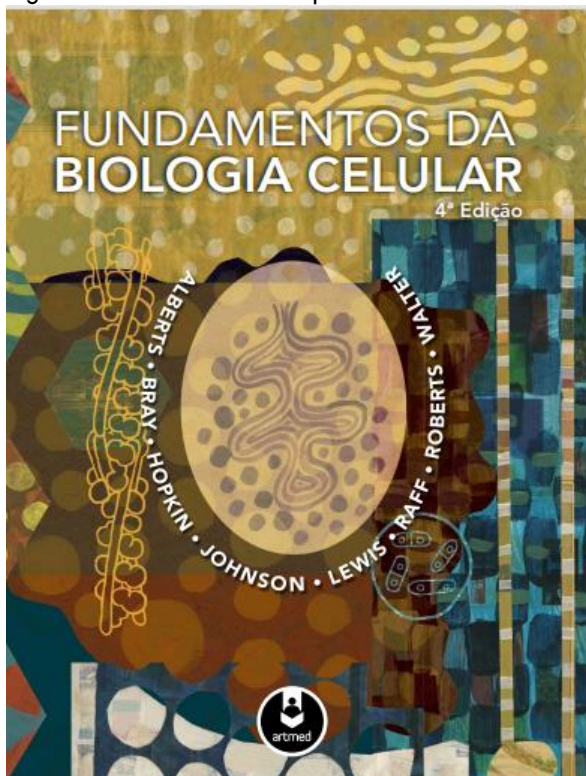
Quadro 1: Livros didáticos analisados

LIVROS	CÓDIGOS
Télaris – Ciências. Fernando Gewandsznajder e Helena Pacca 6º Ano. Fundamental.	LD1
Araribá Mais Ciências; Maria Rosa Carnevalle. 6º Ano. Fundamental	LD2
BIO- Sônia Lopes; Sergio Rosso. Volume1. Ensino Médio.2016.	LD3
Biologia Hoje. Sergio Linhares; Fernando Gewandsznajder e Helena Pacca. Volume 1. Ensino Médio.2016.	LD4

Fonte: Os Autores (2013)

Como fonte de saber sábio, utilizou-se o livro de ensino superior: Fundamentos da biologia celular e molecular – 4ª edição 2017. (Figura 1).

Figura 1- Livro de ensino superior usado como fonte de saber sábio.

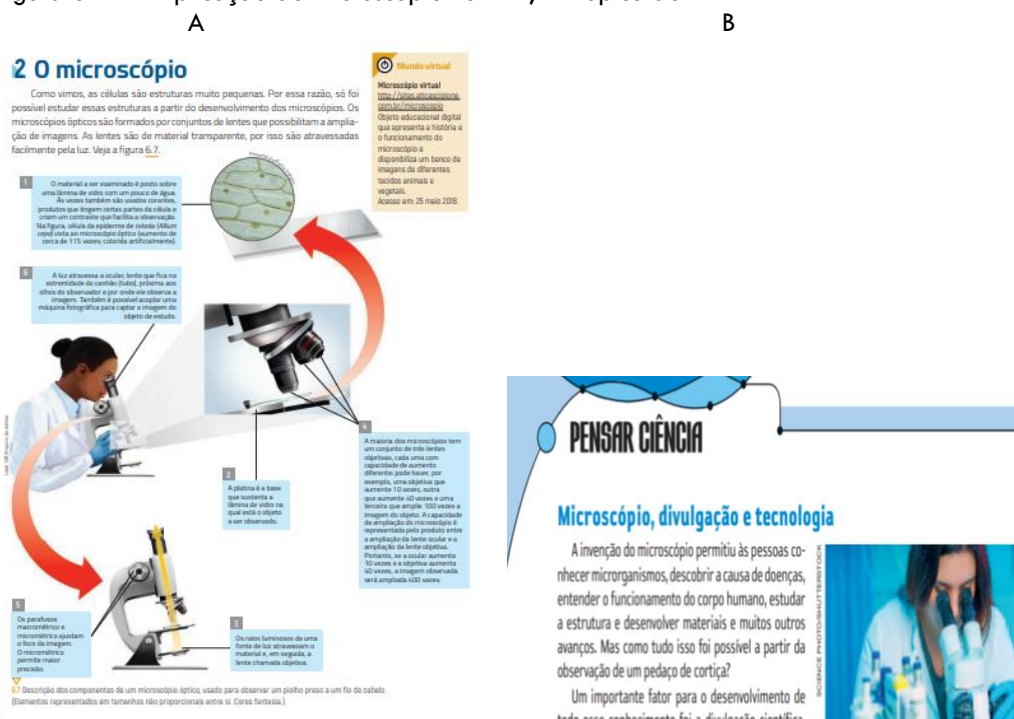


Fonte: Os autores (2023).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os LD1 e LD2 são livros voltados a área do ensino fundamental, isso resulta de uma linguagem mais clara aos adolescentes que estão obtendo seu conhecimento sobre célula mais didático e claro, com isso os autores pecaram em explicar a microscopia eletrônica, focando somente na óptica e sua importância para o avanço da ciência. O LD1 em comparação com o LD2 entra no âmbito para explicar os componentes do microscópio de uma forma clara e objetiva, já o LD2 aborda somente como um tópico histórico e seus avanços, deixando o estudante cego na abordagem microscópica. (Figura 02 a e b).

Figura 02: A: Explicação do Microscópio no LD1; B: Tópico do LD2



Fonte: Os autores (2023).

Nos LD3 e LD4, como são livros do ensino médio, o conteúdo é abordado de uma maneira mais extensa e contempla a microscopia eletrônica em ambos os livros didáticos, mas há diferenças significativas em ambos os livros como a questão da qualidade da explicação dos processos microscópios, tipos dos mesmos e como é o funcionamento teórico, físico e químico. A história da microscopia é explicada em ambos os livros. O LD3 explica os tipos de microscópios, incluindo o óptico: Biológico e Estereoscópio e inclui o eletrônico. (Figura 03).

Figura 03: Tipos de microscópios ilustrados pelo LD3.

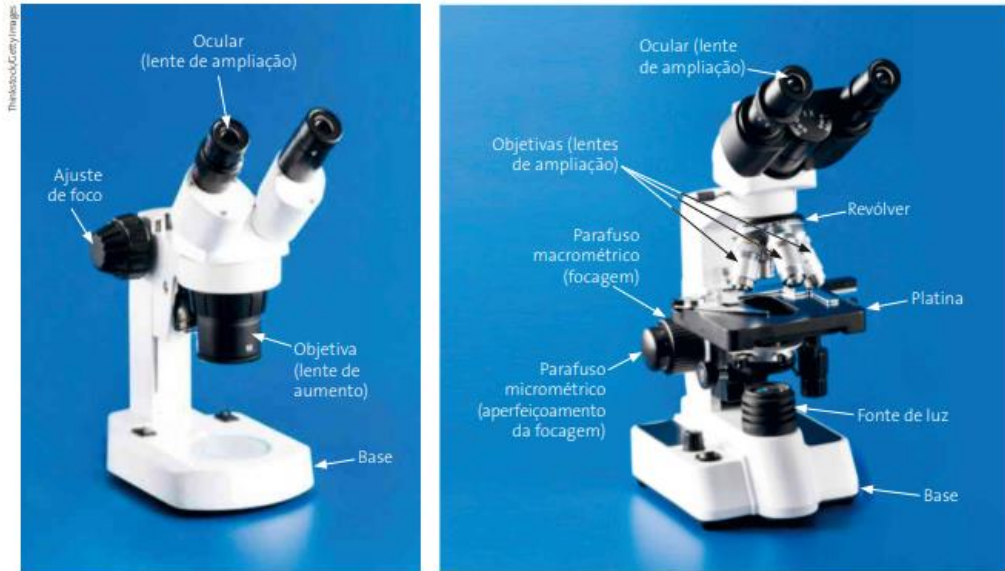


Figura 9.6. À esquerda, fotografia de microscópio estereoscópico. À direita, fotografia de microscópio biológico.

Fonte: Os autores (2023).

O LD4 em comparação do LD3, detalhou absurdamente o funcionamento do microscópio óptico e eletrônico e seus detalhes para os estudantes do ensino médio.(Figura 04 A e B).

Figura 04: A: Ilustração da Microscopia Eletrônica no LD4; B: Ilustração Óptica no LD4

**Figura 6.6** A) microscópio eletrônico de transmissão (Instituto Butantan, São Paulo, SP, 2012). B) esquema do microscópio, as lentes e os condensadores são eletrônicos para desviar o feixe de elétrons que atravessa o objeto e forma a imagem. C) célula humana com aumento de cerca de 10 mil vezes (Imagem colorizada por computador). Os elementos da imagem não estão na mesma escala, cores fantasia.)

Mais tarde foi desenvolvido o **microscópio eletrônico de varredura** (figura 6.7), no qual um feixe de elétrons, em vez de atravessar o objeto, varre-o como se fosse uma pessoa sentindo com os dedos o relevo de uma superfície. Desse modo, consegue-se uma imagem tridimensional do objeto. Essa imagem é formada por elétrons refletidos, e não por elétrons que atravessam o material.

Com esse aumento obtido pelo microscópio é possível ver as células e algumas de suas estruturas internas. As fotos tiradas com microscópios são chamadas **micrografias**. Observe a figura 6.4 e entenda melhor o funcionamento do microscópio.

**Figura 6.4** O microscópio de luz é um conjunto formado, entre outros componentes, por duas lentes (objetiva e ocular) parafusadas sobre o microscópio (deixa com maior precisão) para ajustar a focagem, fonte de luz e condensador para preparar um feixe de luz sobre o objeto, platina, que sustenta a lâmina de vidro no qual está o objeto; parte mecânica de suporte. O aumento da imagem é obtido pela multiplicação do aumento de objetiva pelo aumento da ocular.

Um objeto que se queira observar com esse aparelho precisa ser atravessado por um feixe de luz, portanto, é preciso que ele seja suficientemente fino. Em observações mais grosseiras, um corte fino do objeto pode ser obtido com uma lâmina de barbear. Em observações mais cuidadosas, o corte deve ser feito com um aparelho especial, o **microtomo**. Nesse caso, o objeto, comumente um tecido animal ou vegetal, deve ser colocado em blocos de parafina para facilitar o corte, processo conhecido como **inclusão**.

A maioria das estruturas celulares, no entanto, só pode ser vista ao microscópio comum se a célula for previamente tratada com **corantes**. Cada corante reage apenas com determinadas estruturas da célula, fornecendo um contraste que facilita sua observação (figura 6.5).

No caso de observações demoradas e repetidas, usam-se **fixadores** (álcool e formal, por exemplo), substâncias que conservam a célula, alterando o mínimo possível sua estrutura.

**Figura 6.5** Células observadas ao microscópio óptico em **ausência de corantes**. A) célula humana de mucosa bucal (aumento de cerca de 700 vezes, com uso de corante). B) sangue humano (aumento de cerca de 400 vezes, com uso de corante). Os elementos mais numerosos são os hemácias. Acima, um glóbulo branco (leucócito).

A Citologia ganhou impulso muito grande com a invenção do **microscópio eletrônico de transmissão** (figura 6.6), em 1939. Nesse microscópio, em vez de lentes de cristal, há bobinas que funcionam como eletroímãs desviando o feixe de elétrons (Fenômeno estudado em Eletromagnetismo, um ramo da Física).

A imagem pode ser observada em uma tela ou em uma micrografia. Com essa técnica, pode-se alcançar um poder de resolução de até 0,0004 µm. A utilização desse tipo de microscópio e de outras técnicas sofisticadas permite obter informações mais detalhadas sobre a estrutura e a composição química da célula, além de seus processos metabólicos.

Fonte: Os autores (2023).

Sobre o aspecto ilustrativo dos livros, diferentemente do trabalho de (Soares, et al, 2021), no qual houve uma grande diversidade de imagens, devido ao conteúdo de poríferas, nesse trabalho todas as imagens apresentavam características e resoluções excelentes, no qual se propuseram a apresentar, visto exemplo como

o LD2, não se propôs a explicar aspectos básicos de funcionamento do microscópio óptico para os estudantes do ensino fundamental.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente estudo desenvolvido realizado pelos mestrandos do programa de Biologia Celular e Molecular, possibilitou uma análise sobre a qualidade do conteúdo contido nos livros didáticos. Pode-se afirmar que após essa avaliação, colocando o livro do saber sábio como centro para o restante grupo dos livros didáticos, os que mais houve uma aproximação foram os livros do ensino médio, mas cada autor de seus respectivos livros escolheu abordar o tema de maneira diferentes no qual gerou riquezas em pontos como: Explicação técnica do microscópio aos tipos de ramificações que possuem na indústria científica. E no ensino fundamental somente focou-se na óptica deixando os aspectos eletrônicos de lado. Por fim esse trabalho permitiu uma ampla visão sobre a transposição didática nos conteúdos analisados e comparados, evidenciando falhas ou ausência de informações para a compreensão microscópica e sua importância dentro da biologia celular.

### **APOIO FINANCEIRO**

Este projeto conta com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil (CAPES).

### **REFERÊNCIAS**

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A. et al. Fundamentos da Biologia Celular. Uma Introdução à Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2017.
- CARNEVALLE, Maria Rosa. ARARIBÁ MAIS CIÊNCIAS. São Paulo: Moderna, 2018. 6 v.
- CHEVALLARD Y. La Transposición Didáctica: del saber sabio al saber enseñado. La Pensée Sauvage, Argentina. (1991).
- GEWANDSZNAJDER, Fernando; PACCA, Helena. Teláris Ciências. 3. ed. São Paulo: Ática, 2018. 6 v.
- FILHO, Jose de Pinho Alves. ATIVIDADES EXPERIMENTAIS: DO MÉTODO À PRÁTICA CONSTRUTIVISTA. Florianópolis, 2001. <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/79015/161719.pdf>. Acesso em 01 de abril de 2023.
- GEWANDSZNAJDER, Fernando; PACCA, Helena. Biologia Hoje. São Paulo: Ática, 2016. 1 v.
- LOPES, Sônia; ROSSO, Sergio. BIO. 3. ed. São Paulo: Saraiva, 2016. 1 v.
- POLIDORO, Lurdes de Fátima; STIGAR, Robson. A Transposição Didática: a passagem do saber científico para o saber escolar. Ciberteologia- Revista de Teologia e Cultura, São Paulo, v. 27, p. 1-7. Disponível em: [http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/artigos\\_teses/2010/Ensino\\_religioso/transposicao\\_didatica.pdf](http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/artigos_teses/2010/Ensino_religioso/transposicao_didatica.pdf). Acesso em: 01 abr. 2023.
- SOARES, Gabriel do Nascimento et al. TRANSPOSIÇÃO DIDÁTICA NO ENSINO DE ZOOLOGIA: UMA ANÁLISE DO CONTEÚDO “FILO PORIFERA”. 6. ed. Paraná: Atena, 2021.

## **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNE DAS PORÇÕES N- E C- TERMINAIS DE UMA PROTEÍNA RICA EM GLICINAS SALIVAR DO CARRAPATO *Rhipicephalus microplus***

**Renata Perotto de Souza<sup>1</sup>, Mariana Vieira Dalla Valentina<sup>1</sup>, Bruna Ferreira Leal<sup>1</sup>, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

### **INTRODUÇÃO**

Os carrapatos, por serem ectoparasitos e necessitarem permanecer em um hospedeiro durante maior parte de sua vida, possuem um diverso repertório de proteínas imunomodulatórias e antihemostáticas, principalmente em sua saliva. Estas proteínas, além de serem utilizadas na adaptação ao hospedeiro, também podem ser importantes na defesa contra patógenos, constituindo, desta forma, em alvos para o desenvolvimento de alternativas ao controle químico dos carrapatos, especialmente no desenvolvimento de vacinas (Francischetti et al., 2009). Destas, destacam-se as proteínas ricas em glicinas (GRPs), as quais apresentam uma grande variedade em características estruturais e funcionais, sendo encontradas em diversos organismos procaríotos e eucaríotos, incluindo carrapatos. Nestes, as GRPs apresentam funções de estruturação do cone de cimento, evasão do sistema

imune e ação antimicrobiana, principalmente durante as fases de ingurgitamento, sendo que no carrapato *Rhipicephalus microplus*, em especial, uma proteína rica em glicina denominada RmGRP foi identificada e parcialmente caracterizada (Havlíková et al., 2009; Leal et al., 2018; Zhou et al., 2006).

### **OBJETIVOS**

Clonar e expressar em vetor procariótico as regiões codificadoras para as porções N- e C- terminais de uma proteína rica em glicinas salivar do *Rhipicephalus microplus* (RmGRP). Purificar as proteínas recombinantes e verificar o perfil de reconhecimento destas proteínas pelo soro de hospedeiros infestados.

### **METODOLOGIA**

As regiões codificadoras para as regiões N- e C-terminal da RmGRP foram produzidas por síntese química (empresa GenOne) e inseridas no vetor procariótico pET23a (Novagen). Os plasmídeos recombinantes foram eletroporados na cepa BL21 de *Escherichia coli* e as expressões foram induzidas em caldo LB contendo IPTG (2 mM), a partir de inóculo de 1:100, sendo incubadas por 18 h a 37°C a 170 rpm. Após, o material obtido foi sonificado e as proteínas recombinantes foram purificadas utilizando cromatografia de afinidade em colunas contendo níquel imobilizado. A eluição foi feita utilizando tampão contendo Imidazol e a identificação de tamanho e o reconhecimento específico foi feito mediante SDS-PAGE e Western Blot, respectivamente. A partir da obtenção de ambas proteínas recombinantes purificadas em quantidades acima de 1mg, serão avaliadas em ensaios de ELISA e Western-blot para verificação de presença ou ausência de imunodominância de alguma região frente a soros de animais infestados.

### **RESULTADOS**

Dos resultados até então obtidos, demonstram que as regiões codificadoras estão corretamente inseridas em vetor plasmidial. A expressão de proteínas recombinantes N- e C-terminais apresentam os tamanhos previstos, 7 KDa e 9 KDa, respectivamente, sendo reconhecidos especificamente por anticorpos anti- polihistidina.

### **CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Ainda se é necessário a otimização do processo de expressão bacteriana, assim, como para averiguar a imunogenicidade destas proteínas frente ao soro de bovino infestado.

Apoio Financeiro: CnpQ, CAPES, FAPERGS, INCT-Entomologia Molecular.

Palavras Chaves: Imunogenicidade; *R. microplus*; parasito-hospedeiro;

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Francischetti, I. M., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., & Ribeiro, J. M. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 14, 2051.
- Havlíková, S., Roller, L., Kočí, J., Trimnell, A. R., Kazimírová, M., Klempa, B., & Nuttall, P. A. (2009). Functional role of 64P, the candidate transmission-blocking vaccine antigen from the tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. *International journal for parasitology*, 39(13), 1485-1494.
- Leal, B. F., Alzugaray, M. F., Seixas, A., Vaz, I. D. S., & Ferreira, C. A. S. (2018). Characterization of a glycine-rich protein from *Rhipicephalus microplus*: tissue expression, gene silencing and immune recognition. *Parasitology*, 145(7), 927- 938.
- Zhou, J., Gong, H., Zhou, Y., Xuan, X., & Fujisaki, K. (2006). Identification of a glycine-rich protein from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides* and evaluation of its vaccine potential against tick feeding. *Parasitology research*, 100, 77-84.

## **GENÔMICA DA HIBRIDAÇÃO ENTRE LEOPARDUS GUTTULUS E LEOPARDUS GEOFFROYI**

**Fernanda de Jesus Trindade<sup>1</sup>; Maximilian Genetti<sup>2</sup>, Caroline Charão Sartor<sup>1,3</sup>, Henrique Vieira Figueiró<sup>1,4</sup>, Russell Corbett-Detig<sup>2</sup>, Eduardo Eizirik<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre-RS, Brasil. <sup>2</sup>Department of Biomolecular Engineering, UCSC, Santa Cruz-CA, USA. <sup>3</sup>Wildlife Conservation Research Unit, University of Oxford, Oxfordshire, UK. <sup>4</sup>Smithsonian-Mason School of Conservation, George Mason University, Front Royal-VA, USA.

## **INTRODUÇÃO**

Leopardus é um gênero de felídeos neotropicais, de radiação rápida e recente com ocorrência de hibridação (Johnson et al., 1999; Trigo et al., 2008). Essa hibridação é entre *L. guttulus* e *L. geoffroyi*, com uma zona híbrida ativa no centro do estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil, sobre a qual não sabemos com detalhe a extensão geográfica e potenciais causas desse processo (Trigo et al., 2013). Nesse sentido, o uso de genomas completos vem se mostrando uma ferramenta poderosa para entender dinâmica de miscigenação entre espécies, especialmente aquelas com histórias evolutivas complexas.

## **OBJETIVOS**

Caracterizar de forma detalhada a origem e dinâmica evolutiva da hibridação entre *L. guttulus* e *L. geoffroyi*. Os objetivos específicos são: (i) caracterizar a composição genômica da zona híbrida no sul do Brasil, utilizando dados de genomas completos; (ii) Identificar e caracterizar, nos indivíduos híbridos, as regiões genômicas introgrididas de cada uma das espécies parentais; (iii) Datar esse processo de hibridação, com base no tamanho de blocos genômicos introgrididos nas populações híbridas.

## **MÉTODOS**

Foram amostrados 306 indivíduos morfologicamente identificados como *L. guttulus* ou *L. geoffroyi* em um transecto de cerca de 4000km indo do Sudeste Brasileiro até centro da Argentina, também incluindo sul da Bolívia. O DNA total extraído dessas amostras foi usado para construção de bibliotecas genômicas para sequenciamento a baixa cobertura de genoma completo. Os dados brutos de sequenciamento foram processados por meio de pipeline de bioinformática que incluiu desde filtros de qualidade a correções de mapeamento contra genoma de referência e mitogenoma de *L. geoffroyi*. Os genótipos de cada indivíduo foram estimados e utilizados para avaliar estrutura populacional por meio de modelagem de populações ancestrais e Análise de Componentes Principais. Para a identificação dos segmentos introgrididos nos híbridos, baseando-se no resultado de estrutura populacional, selecionamos os indivíduos menos miscigenados para a identificação dos sítios informativos de ancestralidade, os quais foram utilizados para identificar os segmentos de cada espécie parental nos genomas dos híbridos e estimar há quantas gerações essa miscigenação vem ocorrendo (Gompert et al., 2017).

## **RESULTADOS**

Nossos resultados mostraram que cerca de 50% da nossa amostra era composta por indivíduos miscigenados, sendo a maioria deles inicialmente identificados como *L. geoffroyi*. A média de proporção de ancestralidade desse conjunto de híbridos foi de 0.74/0.26 (*L. geoffroyi*/*L. guttulus*), ou seja, com uma forte dominância de ancestralidade genética – e fenotípica – de *L. geoffroyi* entre eles. Adicionalmente, grande parte desses híbridos estão distribuídos no bioma Pampa, onde *L. geoffroyi* ocorre. Além disso, ao observar a estrutura geral das populações, notamos a presença de uma estruturação interna em *L. guttulus*, adicionalmente à ausência de gradiente de mistura em direção a essa espécie – o que é completamente oposto ao observado para *L. geoffroyi*. Ao explorar os segmentos introgrididos nos híbridos, notamos que praticamente todos os indivíduos amostrados no RS tem alguma assinatura de miscigenação. A tendência de introgressão segue um padrão geográfico: ao norte da área mais ativa da zona híbrida, na Mata Atlântica, há apenas pequenos segmentos de genoma de *L. geoffroyi* em indivíduos fenotipicamente *L. guttulus*; já ao sul, no Pampa, há apenas pequenos segmentos de genoma de *L. guttulus* em indivíduos fenotipicamente *L. geoffroyi*. Nessas áreas mais distantes da zona de contato, as estimativas de mistura genética apontam que, em média, estes indivíduos são miscigenados há até 150 gerações. Por outro lado, na região de transição entre os dois biomas, observamos uma variação maior de blocos genômicos das espécies parentais, com estimativas de datação indicando que a miscigenação é bastante recente (em média ~50 gerações, ou seja, não mais do que 200 anos).

## **CONCLUSÕES**

Observamos que esse processo de hibridação é assimétrico e bidirecional, com híbridos ocorrendo principalmente ao sul da zona de contato, com aproximadamente 300 km de largura e predominância de ancestralidade de *L. geoffroyi*. Adicionalmente, os resultados de datação mostram que esse processo é recente, indicando que atividades humanas levando à fragmentação e alteração da Mata Atlântica e do Pampa são uma causa ou ao menos um intensificador deste fenômeno. Isto parece ser particularmente relevante no bioma Pampa, visto que



este vem sendo intensamente descaracterizado nas últimas décadas (Oliveira et al., 2017). Sabendo-se que processos de hibridação impactam a evolução dos organismos (p. ex. Abbott et al., 2013; Todesco et al., 2016), que ambas as espécies são consideradas ameaçadas, que temos uma invasão dos híbridos no habitat de *L. geoffroyi*, os resultados apresentam um potencial relevante de contribuir para o embasamento de estratégias de conservação com foco nestes felídeos.

#### **APOIO FINANCEIRO**

CNPq, CAPES, INCT-EECBio e FAPERGS (programa PRONEX: FAPERGS/CNPq 12/2014; Programa Pesquisador Gaúcho 2019).

#### **PALAVRAS-CHAVE**

Introgessão; filogenia; genômica populacional; ancestralidade local; Felidae.

#### **REFERÊNCIAS**

- ABBOTT, R. et al. Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 26, n. 2, p. 229–246, 2013.
- GOMPERT, Z.; MANDEVILLE, E. G.; BUERKLE, C. A. Analysis of Population Genomic Data from Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 48, n. 1, p. 207–229, 2017
- JOHNSON, W. E. et al. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Molecular Ecology*, v. 8, n. s1, p. S79–S94, 1999.
- OLIVEIRA, T. E. DE et al. Agricultural land use change in the Brazilian Pampa Biome: The reduction of natural grasslands. *Land Use Policy*, v. 63, p. 394–400, 2017.
- TODESCO, M. et al. Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications*, v. 9, n. 7, p. 892–908, 1 ago. 2016.
- TRIGO, T. C. et al. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology*, v. 17, n. 19, p. 4317–4333, out. 2008.
- TRIGO, T. C. et al. Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. *Current Biology*, v. 23, n. 24, p. 2528–2533, 16 dez. 2013

## **IDENTIFICAÇÃO DE MICROPOTEÍNAS CODIFICADAS POR smORFs EXPRESSAS EM UM MODELO DE INFECÇÃO in vitro DE SARS-CoV-2 POR MEIO DE ANÁLISE PROTEOGENÔMICA**

**Laura Calle González<sup>1,2</sup>, Ariel Moura Maia<sup>1,2</sup>, Nathalia Sperotto<sup>1</sup>, Pablo Machado<sup>1,2,3</sup>, Luiz Augusto Basso<sup>1,2,3</sup>, Cristiano Valim Bizarro<sup>1,2</sup>**

*<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.*

#### **INTRODUÇÃO**

No final de 2019 foi reportado o novo coronavírus (CoV) humano em Wuhan - China, responsável pela infecção de vários pacientes com sintomas clínicos de pneumonia viral. Identificado como SARS-CoV-2, o vírus causador da COVID-19 foi o sétimo CoV humano conhecido e o terceiro identificado como altamente patogênico (WHO, 2020). O estudo das alterações moleculares decorrentes da infecção pelo SARS-CoV-2 na célula hospedeira podem revelar proteínas de interesse para o melhor entendimento do processo infeccioso e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Tradicionalmente, as pipelines de anotação de genomas estabelecem um limite inferior de tamanho das ORFs (do inglês Open Reading Frame) que poderiam codificar um possível gene, com pelo menos 100 códons. As ORFs inferiores, conhecidas como pequenas ORFs (small ORFs - smORFs), são excluídas por um corte arbitrário, e embora uma alta proporção delas possa ser representada por sequências não funcionais, nos últimos anos tem-se acumulado evidências de que existe um número substancial de genes contendo smORFs que estão sendo ignorados nessa etapa de filtragem (ORR et al., 2020). Ainda que muitos dos papéis funcionais das microproteínas (como são conhecidos os produtos gênicos das smORFs) permaneçam desconhecidos

e inexplorados, muitas delas têm sido caracterizadas como biologicamente ativas, implicadas na regulação de diferentes processos celulares e fisiológicos (MIRAVET-VERDE et al., 2019).

### **OBJETIVO**

Identificar microproteínas codificadas por pequenas ORFs (smORFs) que estão expressas pela célula hospedeira e pelo vírus em um modelo de infecção celular de SARS-CoV-2.

### **MÉTODOS**

O isolado clínico de SARS-CoV-2/SP02/human/2020/BRA (número de acesso GenBank MT126808.1) foi propagado em células Vero E6 (ATCC CCL-81) e o título viral foi determinado por ensaio de placa. Utilizando a linhagem celular Calu-3 derivada de adenocarcinoma de pulmão humano, foram infectadas células durante 1 h com SARS-CoV-2 com MOI 10 ou meio como controle de infecção mock. Após três tempos de pós-infecção diferentes com SARS-CoV-2, o sobrenadante das culturas celulares foi coletado para titulação viral por ensaio de placa e RT-PCR. As células infectadas com SARS-CoV-2 foram recuperadas com H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>. As amostras foram inativadas por calor a 80°C por 30 minutos após padronização da metodologia e verificação de perfil proteico (corrida em gel SDS-PAGE 12%) de amostras inativadas com diferentes condições de calor e tempos diferentes. O procedimento de inativação foi confirmado infectando monocamadas de Vero E6 com as amostras. Os extratos proteicos completos das amostras foram obtidos como descrito anteriormente (Grega et al., 2020). Brevemente, as amostras foram sonicadas no gelo, operando a 21% de amplitude. Depois, as proteínas foram precipitadas adicionando TCA gelado para uma concentração final de 10% e centrifugadas a 16.000 g durante 20 min 4 °C. A concentração de proteínas foi determinada usando o Kit de Ensaio de Proteína Pierce BCA (Thermo Scientific). Por fim, todas as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas durante 24h. Após, foram armazenadas (-20°C) até serem processadas para as análises de LC-MS/MS.

### **RESULTADOS**

Quando observado o perfil de corrida em gel dos extractos protéicos das cinco condições diferentes de inativação com calor avaliadas sobre as amostras (sem vírus) reportadas previamente (Case et al., 2020) não teve diferenças com o controle do extrato proteico sem autoclarar. Entretanto, quando validada a metodologia de inativação (com vírus) foi possível detectar partículas viáveis de SARS-CoV-2 após a inativação durante 60 min 56 °C. As outras condições de inativação com calor avaliadas se mostraram eficazes, sem evidência de partículas viáveis de SARS-CoV-2. Para determinar a cinética da infecção do vírus, os sobrenadantes das culturas celulares de Calu-3 infectadas aos diferentes tempos de infecção serão quantificados por meio de ensaio de placa e quantificação do RNA viral (qRT-PCR). Os espectros cromatográficos dos peptídeos presentes no modelo de infecção celular de SARS-CoV-2 serão obtidos utilizando o sistema NanoAcquity HPLC conectado a um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Uma vez obtidos os espectros cromatográficos, serão gerados os bancos de dados personalizados para a análise bioinformática que permitirá a busca e identificação dos peptídeos. Finalmente, iremos inferir a função das microproteínas identificadas, verificando a presença de domínios proteicos conservados na sequência de aminoácidos das ORFs ou por homologia estrutural.

### **APOIO FINANCEIRO**

CAPES, FAPERGS, BNDES, CNPq.

### **PALAVRAS-CHAVE**

SARS-CoV-2, Microproteínas, smORFs, Proteogenômica Espectrometria de massa.

### **REFERÊNCIAS:**

- CASE, James Brett et al. Growth, detection, quantification, and inactivation of SARS-CoV-2. *Virology*, [s. l.], v. 548, p. 39–48, 2020.
- GREGA, Lucia et al. Shotgun proteomics analysis of SARS-CoV-2-infected cells and how it can optimize whole viral particle antigen production for vaccines. *Emerging Microbes and Infections*, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–18, 2020.
- MIRAVET-VERDE, Samuel et al. Unraveling the hidden universe of small proteins in bacterial genomes. *Molecular Systems Biology*, [s. l.], v. 15, n. 2, 2019.

ORR, Mona Wu et al. Alternative ORFs and small ORFs: shedding light on the dark proteome. *Nucleic Acids Research*, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 1029–1042, 2020.

WHO. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report – 22. [s. l.], 2020.

## **SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUBERCULAR DE 4-AMINO-N-(4-BENZILOXIBENZIL) QUINOLINAS**

**Estevão da Silveira Grams 1,2, Pablo Machado 1,2**

1 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS,  
2 Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional, Tecnopuc, PUCRS

### **INTRODUÇÃO**

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), esta doença acomete o trato respiratório com destaque para os pulmões. Foi responsável por de mais de 10,6 milhões de indivíduos infectados e 1,6 milhão de óbitos ocorridos no mundo inteiro em 2021, segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2022). Além disso, a dificuldade de tratamento das infecções ocasionadas por cepas de Mtb resistentes aos fármacos disponíveis e a falta de adesão ao longo tratamento leva a necessidade urgente de atualização terapêutica. As 4-aminoquinolinas têm sido descritas como compostos não citotóxicos capazes exercer atividade inibitória sobre cepas de Mtb sensíveis à isoniazida, fármaco utilizado para o tratamento da TB (MEDAPI et al., 2015). Consequentemente, esta classe representa um ponto de partida coerente para a obtenção de novos candidatos a fármacos anti-TB.

### **OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi sintetizar derivados da classe 4-amino- N-(4-benziloxibenzil)quinolinas para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) na cepa laboratorial H37Rv de Mtb.

### **MÉTODOS**

As 28 estruturas derivadas das 4-amino-N-(4- benziloxibenzil)quinolinas foram obtidas a partir de cinco etapas sintéticas. Na primeira etapa, ocorreu a reação de substituição nucleofílica de segunda ordem a partir 4-cianofenol e brometos de benzila substituídos para obtenção de 4- (benziloxi)benzônitrilas (YEON et al., 2018). Na etapa seguinte foi realizada a redução do grupo nitrila utilizando tetraidroaluminato de lítio (Li(AlH<sub>4</sub>)) para se obter 4-(benziloxi)benzilaminas (YEON et al., 2018). Passando para terceira etapa, ocorreu a reação de síntese das 2,6-bisubstituídas-4-hidroxiquinolinas, por meio da ciclocondensação das anilinas p-substituídas com os β-cetoésteres desejados (GIACOBBO et al., 2017). Na quarta etapa as 2,6-bisubstituídas-4- hidroxiquinolinas foram reagidas com cloreto de fosforila (POCl<sub>3</sub>), onde foram obtidas as 2,6-bisubstituídas-4-cloroquinolinas (Adaptada de NAYAK; RAMPRASAD; DALIMBA, 2016). A última etapa, consistiu na reação de alquilação das respectivas 2,6-bissubstituídas-4-cloroquinolinas com as 4-(benziloxi)benzilaminas na qual foram obtidas 4-amino-N-(4- benziloxibenzil)quinolinas (BECHERER et al., 2015). Todos os compostos sintetizados foram isolados, purificados e suas estruturas elucidadas pelo método espectroscópico de ressonância magnética nuclear (RMN 1H e 13C). A CIM foi estabelecida pelo método REMA (Resazurin Microtitre Assay) utilizando isoniazida (INH) como controle positivo (GIACOBBO et al., 2017)

### **RESULTADOS**

Os resultados de síntese das 4-amino-N-(4- benziloxibenzil)quinolinas apresentaram rendimentos que variaram entre 26- 48%. Quanto aos resultados de atividade biológica das 4-amino-N-(4- benziloxibenzil)quinolinas evidenciaram que o aumento do volume molecular na posição 6 do anel quinolínico, juntamente com os efeitos eletrônicos na posição 4 do anel do grupo oxibenzila representam grupos importantes para a potente ação antimicobacteriana (CIM 2,7 - 26,8 μM) dessas estruturas químicas.

### **CONCLUSÕES**

Estas informações apontam que a classe química sintetizada pode apresentar futuros candidatos para o desenvolvimento de protótipos de medicamentos para o tratamento da tuberculose.

**APOIO FINANCEIRO**

CNPq/FAPERGS/CAPES/BNDES

**PALAVRA-CHAVE**

Quinolinas,4-amino-N-(4-benziloxibenzil)-quinolinas,antimicrobianos, Mycobacterium Tuberculosis

**REFERÊNCIAS**

- BECHERER, J. D. et al. Discovery of 4-Amino-8-quinoline Carboxamides as Novel, Submicromolar Inhibitors of NAD-Hydrolyzing Enzyme CD38. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, n. 17, p. 7021–7056, 10 set. 2015.
- GIACOBBO, B. C. et al. New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides against *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 126, p. 491–501, jan. 2017.
- MEDAPI, B. et al. 4-Aminoquinoline derivatives as novel *Mycobacterium tuberculosis* GyrB inhibitors: Structural optimization, synthesis and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 103, p. 1–16, out. 2015.
- NAYAK, N.; RAMPRASAD, J.; DALIMBA, U. Synthesis and antitubercular and antibacterial activity of some active fluorine containing quinoline–pyrazole hybrid derivatives. *Journal of Fluorine Chemistry*, v. 183, p. 59–68, mar. 2016.

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ISOLADOS BACTERIANOS DO AQUÍFERO GUARANI SUBMETIDOS AO SELÊNIO**

**Agatha do Canto Shubeita<sup>1, 2</sup>, Caroline Menegotto<sup>1, 2</sup>, Rafaela Wong Davi<sup>1, 2</sup>, Renata Medina da Silva<sup>1, 2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup>Grupo de Geobiologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

**INTRODUÇÃO**

Bactérias do Sistema Aquífero Guarani (SAG) são expostas à uma contínua carga de metais pesados, incluindo selênio (Soares, 2019; Moreno et al., 2021). Diferentes estratégias foram desenvolvidas pelos microrganismos para resistir aos efeitos tóxicos deste metal, como detoxificação do selenito, forma tóxica mais frequentemente encontrada em corpos hídricos (Madigan et al., 2010), que resulta em nanopartículas de selênio elemental (SeNPS) (Tugarova, Kamnev, 2017). Tal estratégia também está alinhada ao ciclo do selênio e a um potencial metabólico para biorremediação de ambientes contaminados com este metal (Williams et al., 2013).

**OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de SeNPS em análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectrometria de raios X por energia dispersiva (EDX), relacionadas a isolados bacterianos do SAG submetidos à 128 mM de selenito de sódio.

**MATERIAIS E MÉTODOS**

Amostras de água de diferentes poços que dão acesso ao SAG foram coletadas em 2018 nas regiões de Quarta Colônia, Alegrete e Candelária, Rio Grande do Sul, Brasil. Isolados bacterianos foram então obtidos a partir destas amostras por meio de culturas em meio Brain Heart Infusion (BHI), e então armazenadas a -80°C com 30% de glicerol (v/v). Dois isolados, um *Lysinibacillus* sp. (GRU33) e um *Bacillus* sp. (VB5) foram recuperados dos seus estoques a -80°C por cultivo em caldo BHI, a 28 °C por 12 a 24 horas. Estes foram utilizados para as análises por terem sido previamente caracterizados como resistentes a selênio. Após, as culturas foram esgotadas em ágar BHI e cultivadas a 28 °C por 12 a 24 horas, para se obter as colônias. A pureza das colônias foi verificada pela técnica de Gram, sob microscopia óptica (1,000 x).

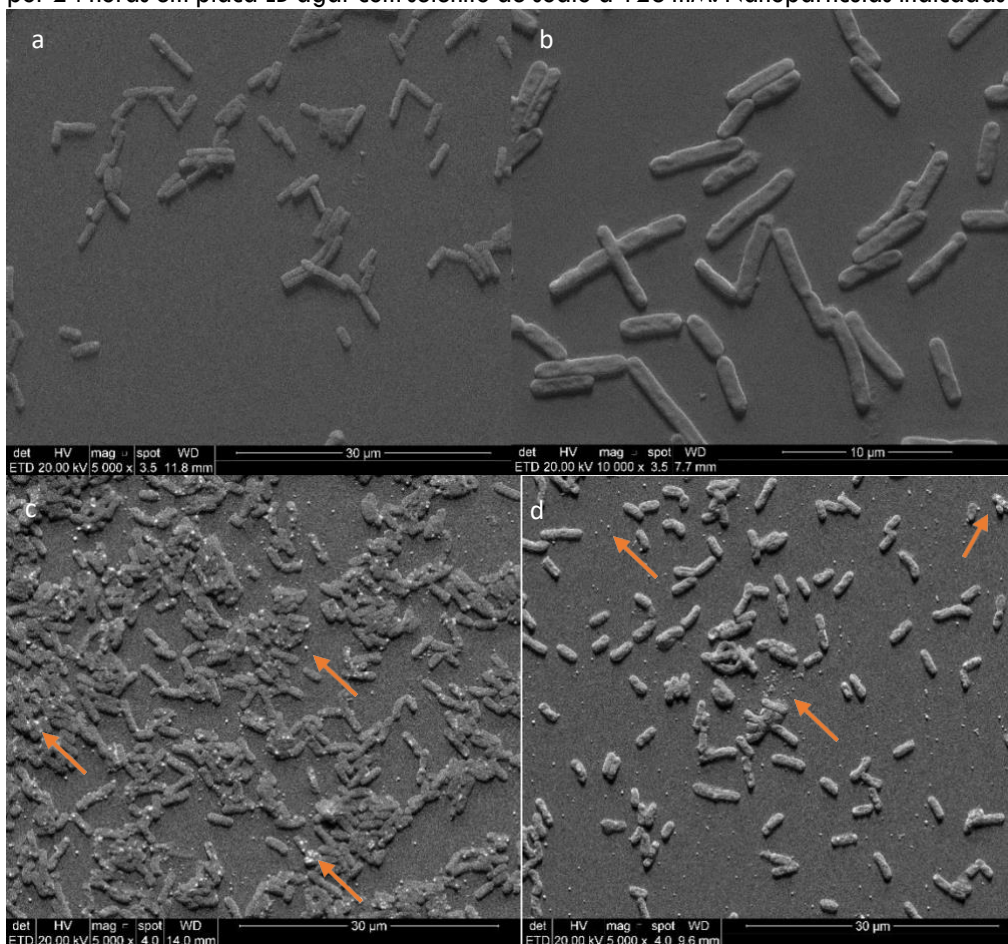
O selênio (encontrado em altos níveis em locais de origem dos isolados, de acordo com Moreno et al., 2021) foi empregado em forma de selenito de sódio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>). O selenito de sódio foi dissolvido em água, para se obter uma concentração de 200 mM, e a solução foi diluída em ágar Luria- Bertani (LB) (10 g/L tripton, 5.0 g/L extrato de levedura, 5.0 g/L cloreto de sódio e ágar) até a concentração de 128 mM.

Os isolados foram cultivados em caldo BHI, a 28 °C por 24 horas. Após, foi feita uma suspensão celular, na qual 1000 µl da amostra em caldo foi centrifugada a 4 rpm por 4 minutos, e lavada 2 vezes com solução salina (0,85%). A densidade óptica da suspensão celular foi ajustada para 0.8 (OD600). Um volume de 10 µl da suspensão celular foi inoculado em uma placa de petri apenas com meio LB ágar, para controle, e em uma placa de petri contendo a solução de selenito de sódio diluída em LB ágar. A placa foi incubada a 28°C por 24 horas. Após, uma porção da colônia crescida foi coletada com a alça de platina, e inoculada em uma lamínula de vidro, contendo 10 µl de água destilada, e a amostra foi seca na chama do bico de Bunsen. Posteriormente, a lamínula contendo a amostra foi metalizada com ouro (BAL-TEC– SCD 050 – Sputter Coater, Balzers, Liechtenstein). Um detector de elétrons secundário a 20,0 kV (Microscopia Eletrônica de Varredura, INSPECT-F50, FEI Company Inspect, Eindhoven, Holanda) foi usado para examinar e obter as imagens. Para a análise elementar das amostras, um Microscópio Eletrônico de Varredura de Emissão de Campo (INSPECT-F50, FEI Company) foi usado para realizar uma espectrometria de raios-X por dispersão de energia (EDS). As análises foram realizadas pelo Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

### **RESULTADOS**

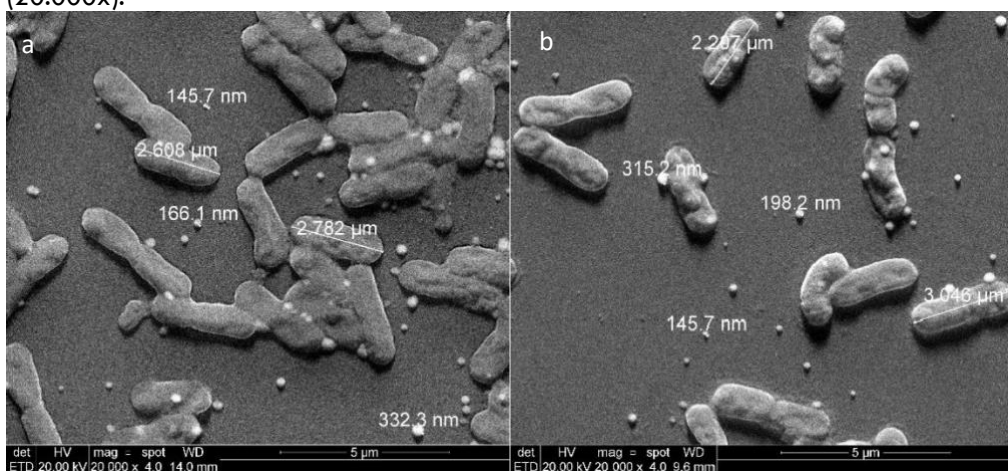
As imagens obtidas em MEV de ambos os isolados submetidos a tratamento com selenito de sódio revelaram a presença de nanopartículas esféricas, com tamanho variado entre 145,7 – 332,2 nm de diâmetro, ao contrário das amostras controle, as quais não tiveram aparição destas partículas (Figura 1 a e b).

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos isolados do SAG (5.000x). (a) VB5 e (b) GRU33 crescidos a 28°C por 24 horas em placa LB ágar sem selenito de sódio; (c) VB5 e (d) GRU33 crescidos a 28°C, por 24 horas em placa LB ágar com selenito de sódio a 128 mM. Nanopartículas indicadas apenas no tratamento.



Fonte: Os autores.

Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicando as medidas das células de (a) VB5 e (b) GRU33 crescidos em placa LB ágar com selenito de sódio a 128 mM e as medidas das nanopartículas observadas (20.000x).



Fonte: Os autores.

Além disso, a análise EDS detectou picos específicos relacionados ao selênio, o que indica que as nanopartículas encontradas possuem selênio em sua composição.

Portanto, nanopartículas com aspectos descritos para SeNPS foram claramente observadas apenas nos tratamentos com selênio. Desta forma, a análise revela evidências de que VB5 e GRU33 são capazes de detoxificar o selênio.

### **CONCLUSÕES**

Análises físico-química das águas do SAG, realizadas pela PUCRS em 2018, na região de Candelária, Rio Grande do Sul, Brasil, detectaram selênio em níveis próximos dos valores máximos permitidos (VMP) em toda a área amostrada (5-10 µg/L) (Moreno et al., 2021). De acordo com a Portaria de Consolidação nº 396/2008 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), o VMP de selênio é 0,01 mg/L. O impacto dos níveis próximos ao VMP de selênio pode estar relacionado aos nossos resultados, uma vez que o isolado VB5 provém da região de Candelária, além de ter apresentado resistência a selênio em experimentos prévios deste projeto. O selênio apresentou valores acima do VMP (CONAMA, 2008) também na localidade de Faxinal do Soturno (Moreno et al., 2021), local de origem do isolado GRU33 que, da mesma forma que VB5, foi previamente caracterizado como resistente a este metal, o que caracteriza um problema ambiental.

Águas subterrâneas são corpos hídricos vulneráveis. A contaminação destes ambientes tem aumentado nas últimas décadas, como resultado das atividades antrópicas. A falta de proteção adequada e o mau planejamento dos poços de acesso a estes reservatórios permitem a entrada de poluentes, o que leva a um desequilíbrio físico-químico (Foster et al., 2007). Os locais do SAG de onde foram isoladas as cepas bacterianas estão localizados em uma região do estado do Rio Grande do Sul no Brasil que tradicionalmente apresenta atividades agrícolas intensivas, de acordo com a Secretaria de Planejamento, Orçamento e Gestão do Atlas Socioeconômico do Rio Grande do Sul (2019). Assim, as bactérias desses locais de GAS têm sido submetidas à presença contínua de altos níveis de diferentes classes de contaminantes, incluindo selênio e diferentes metais pesados (Soares, 2019; Moreno, 2021).

As SeNPS presentes nos resultados obtidos através de MEV indicaram que os isolados VB5 e GRU33 podem ser biocatalisadores que reduzem o selenito, forma tóxica de selênio, detoxificando-o no ambiente (Tugarova, Kamnev, 2017). Além disso, outra evidência de produção de SeNPS foi a coloração vermelha-alaranjada que as colônias dos isolados apresentaram ao serem submetidos ao selênio. A detoxificação do selênio, além de ser uma estratégia de resistir à altas concentrações de selênio, está relacionada à conservação de energia metabólica para microrganismos e biorremediação (Nanchariaiah, Lens, 2015).

As análises elucidaram um mecanismo que auxilia estes microrganismos a resistirem a exposição à altas concentrações de selênio, e contribuem para o entendimento dos impactos causados em microrganismos deste ambiente pouco estudado neste âmbito. Neste contexto, os isolados utilizados neste trabalho apresentaram um potencial para serem aplicados na biorremediação de ambientes contaminados por selênio. A contaminação de ambientes naturais é um problema ecológico significativo, com consequências para a saúde animal, ambiental e humana. Portanto, este estudo reforça a importância de monitorar o surgimento de bactérias resistentes a metais pesados em ambientes naturais, que está relacionado ao conceito de saúde única.

### **APOIO FINANCEIRO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil (CAPES).

### **REFERÊNCIAS**

- BRASIL, Leis, Decretos, etc. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA Nº 396. Date of legislation: 03/04/2008 pp.
- FOSTER, S., et al. Groundwater quality protection: a guide for water-service companies, municipal authorities, and environment agencies. 2. ed. Washington, DC: World Bank GW - MATE, 2007, 114 p.
- MADIGAN, M. T., et al. Brock Biology of microorganisms, 13th ed. Pearson Benjamin-Cummings, San Francisco, CA., 2010.
- MORENO, W. E. G. et al. Hydrogeochemical and Geophysical Evaluation of the Recharge Zone of Guarani Aquifer in Municipally of Candelária, Rio Grande do Sul, Brazil. Geotech Geol Eng, (2021) 39:4593–4613, <https://doi.org/10.1007/s10706-021-01786-z>.
- NANCHARIAIAH, Y.V., LENS, P.N. Ecology and biotechnology of selenium-respiring bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2015 Mar;79(1):61-80. doi: 10.1128/MMBR.00037-14.
- SECRETARIA DE, Planejamento, Orçamento e Gestão. Atlas Socioeconômico do Rio Grande do Sul. <https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/vab-da-agropecuaria>. (2019).

SOARES, G. B. Caracterização hidroquímica de águas subterrâneas aliada ao uso de óxido de grafeno reduzido para adsorção de herbicidas. 2019. 150 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019

TUGAROVA, A.V., KAMNEV, A.A. Proteins in microbial synthesis of selenium nanoparticles. *Talanta* 174, 2017, p. 539–547. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.013>.

## LOSARTAN E MALEATO DE ENALAPRIL MODULAM DE FORMAS DIFERENTES A RESPOSTA DE CÉLULAS VERO FRENTE A INFECÇÃO COM SARS-CoV-2

**Autores:** Julia Huppel Majolo<sup>1</sup>, João I.B. Gonçalves<sup>2</sup>, Renata Perotto de Souza<sup>1</sup>, Sílvia Dias de Oliveira<sup>1</sup>, Cristiano V. Bizarro<sup>3</sup>, Pablo Machado<sup>3</sup>, Luiz A. Basso<sup>3</sup>, Ana Paula D. de Souza<sup>2</sup>, Jarbas Rodrigues de Oliveira<sup>4</sup>, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

<sup>3</sup> Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

<sup>4</sup> Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

### INTRODUÇÃO

A partir do surgimento da pandemia de COVID-19 (Bogoch et al., 2020), a segurança e a influência do uso de anti-hipertensivos no decorrer da doença foram questionadas pela comunidade científica.

Objetivo: Neste estudo, investigamos se o tratamento com os anti-hipertensivos, losartan ou maleato de enalapril, respectivamente um antagonista dos receptores de angiotensina (ARB) e um inibidor da ECA (iECA), em células permissivas ao vírus da síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (SARS-CoV-2) tem algum efeito na replicação do vírus, morte celular e na expressão de biomarcadores.

### MÉTODOS

Para avaliar o potencial destes compostos contra o SARS-CoV-2, células Vero E6 foram infectadas (Multiplicidade de infecção = 0,1) e tratadas in vitro. A viabilidade celular foi medida através do ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Meerlo et al., 2011). Os níveis relativos de RNA viral que codificam a proteína do nucleocapsídeo (N1) e os níveis de expressão de RNA mensageiro (mRNA) do receptor enzima

conversora da angiotensina II (ECA2), interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e da proteína p53 foram avaliados pela técnica da reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) (Schmittgen et al., 2008).

### RESULTADOS

A viabilidade das células Vero E6 mostrou-se superior a 80% em todas as concentrações testadas de ambos os compostos. Em relação aos níveis relativos de mRNA de um dos principais receptores de entrada do SARS-CoV-2 nas células para iniciar a infecção, o receptor ECA2 (Zhou et al., 2020), evidenciamos que sua expressão foi maior nas células infectadas do que nas não infectadas ( $p < 0.0001$ ), e esse mesmo efeito foi observado em todos os grupos tratados quando comparados ao controle não infectado com ambos os compostos ( $p < 0.0001$ ). Comparando os níveis de RNA N1 do SARS-CoV-2, losartan foi capaz de atenuar a infecção na concentração de 1000  $\mu\text{M}$  ( $p = 0.0338$ ). Em contrapartida, o maleato de enalapril não alterou significativamente os níveis de RNA N1 do SARS-CoV-2 em nenhuma das concentrações. Ao analisar os níveis de expressão de mRNA do gene IL-6, observou-se que este foi regulado positivamente nas células infectadas quando comparadas as células não infectadas ( $p < 0.005$ ). Já o losartan na concentração de 1000  $\mu\text{M}$ , foi capaz de diminuir a expressão gênica de IL-6 ( $p = 0.0349$ ) e de p53 ( $p = 0.0395$ ). Por outro lado, o tratamento com maleato de enalapril aumentou a expressão de IL-

6 em comparação com as células infectadas e, também, aumentou significativamente a expressão de IL-18. Por outro lado, nenhuma concentração de losartan alterou os níveis de expressão de IL-18.



## CONCLUSÕES

Até o momento, existem evidências clínicas limitadas, mas sugestivas, demonstrando que os tratamentos anti-hipertensivos podem realmente influenciar de forma positiva o prognóstico da COVID-19 (Zhang et al., 2020; Mirjalili et al., 2022). Portanto, os dados aqui apresentados indicam que esses compostos iECA/ARB modulam de forma distinta as células renais diante da infecção por SARS-CoV-2. Além disso, este trabalho contribui para a elucidação de como moléculas tão comumente prescritas podem atuar em pacientes infectados, enfatizando ainda mais a necessidade de pesquisas adicionais para caracterizar melhor seus efeitos e os mecanismos que podem estar influenciando o curso da COVID-19.

## APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES); CNPq; FAPERGS

## PALAVRAS-CHAVE

COVID-19; anti-hipertensivos; angiotensina II.

## REFERÊNCIAS

- Bogoch II, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MUG, Khan K. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *J Travel Med.* 2020;27(2). doi:10.1093/jtm/taaa008
- Mirjalili M, Soodejani MT, Raadabadi M, Dehghani A, Salemi F. Does Losartan reduce the severity of COVID-19 in hypertensive patients?. *BMC Cardiovasc Disord.* 2022;22(1):116. doi:10.1186/s12872-022-02548-2
- van Meerloo J, Kaspers GJ CJ. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237-45. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5\_20
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Zhang P, Zhu L, Cai J, et al. Association of Inpatient Use of Angiotensin- Converting Enzyme Inhibitors and Angiotensin II. 2020:1671-1681. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.317134
- Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270- 273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7

## INDUÇÃO DO FENÓTIPO SENESCENTE EM CÉLULAS-TRONCO ADIPO-DERIVADAS EXPOSTAS AO AMBIENTE CARACTERÍSTICO DA OBESIDADE

**Lucas Kich Grun1,3, Rafael Moura Maurmann2,3, Juliete Nathali Scholl4, Marcella Elesbão Fogaça3, Carine Raquel Richter Schmitz3,4, Camila Kehl Dias4, Juciano Gasparotto5, Alexandre Vontobel Padoin6, Cláudio Corá Mottin6, Fábio Klamt4, Fabrício Figueiró4, Eduardo Cremonese Filippi-Chiela7,8,9, Fátima Costa Rodrigues Guma4, Florencia María Barbé-Tuana1,2,3**

1Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre (RS) Brasil.

2Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Saúde, Ciências e Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre (RS) Brasil.

3Grupo de Inflamação e Senescência Celular, Laboratório de Immunobiologia, Faculdade de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre (RS) Brasil.

4Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS) Brasil. 5Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas (SP) Brasil.

6Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre (RS) Brasil. 7Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), Brasil.

8Centro de Pesquisas Experimentais, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre (RS), Brasil.

9Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), Brasil.

## **INTRODUÇÃO**

A obesidade é uma condição que compartilha características de doenças relacionadas à idade, uma vez que está relacionada a um estado inflamatório crônico de baixo grau (inflammaging) e progressão do estado de desregulação metabólico (FRANCESCHI et al., 2018; FRASCA; BLOMBERG; PAGANELLI, 2017). Além disso, o acúmulo de células senescentes tem sido casualmente associado ao surgimento de múltiplas doenças relacionadas à idade, como a obesidade (BARBÉ-TUANA et al., 2020). As células-tronco adipo-derivadas (ADSC) são células multipotentes envolvidas na homeostase e regeneração tecidual (MANGUM et al., 2017). Estudos têm demonstrado que a obesidade promove um estado de disfunção metabólica, o qual favorece o comprometimento da função de ADSC (SUN et al., 2018; ZHU et al., 2016).

**OBJETIVOS**  
O objetivo desse trabalho foi explorar como a exposição crônica in vitro ao ambiente inflamatório característico da obesidade, modula as ADSC para um fenótipo senescente (metaflammation).

## **MÉTODOS**

Indivíduos com idade entre 18 e 65 anos foram incluídos no estudo e classificados com base no índice de massa corporal (IMC) e na presença de comorbidades. Foram recrutados 14 voluntários portadores de obesidade extrema ( $IMC \geq 40,0 \text{ kg/m}^2$ ), e sem presença de síndrome metabólica, no período transoperatório de cirurgia bariátrica no Centro de Obesidade e Síndrome Metabólica (COM) do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL- PUCRS). Além disso, 15 indivíduos eutróficos saudáveis ( $IMC = 18,5 \text{ kg/m}^2 - 24,9 \text{ kg/m}^2$ ) que realizaram exames de rotina, e concordaram em participar, também foram recrutados. Foram coletados 10 mL de sangue periférico por punção venosa e o plasma foi utilizado para compor os meios de tratamento. As ADSC (adquiridas comercialmente – Lonza) foram cultivadas e divididas em 3 grupos: (1) CONTROLE – DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS), (2) PE – DMEM suplementado com 9,5% FBS + 0,5% do pool de plasma de indivíduos eutróficos e (3) PO – DMEM suplementado com 9,5% FBS + 0,5% do pool de plasma de indivíduos portadores de obesidade, sem a presença de síndrome metabólica. Durante o tratamento, 50% do meio de cultura das células foi trocado a cada 3 dias. As ADSC foram avaliadas durante 18 dias de tratamento. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A coleta de material biológico foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da PUCRS (640.817) e da UFRGS (760.537).

## **RESULTADOS**

ADSC tratadas com plasma de indivíduos portadores de obesidade (PO) exibiram uma capacidade proliferativa diminuída com parada celular na fase G2/M e aumento da expressão gênica do inibidor de ciclina CDKN1A (P21) após 10 dias de tratamento. Também observamos aumento na atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (SA- $\beta$ -gal), positivamente correlacionada com a expressão da proteína TRF1. Após 18 dias, ADSC tratadas com PO apresentaram aumento na atividade da SA- $\beta$ -gal, na expressão de CDKN2A (P16) e no aumento cumulativo do tamanho nuclear. ADSC tratadas com PO apresentaram aumento na fosforilação de NF- $\kappa$ B após 10 dias, enquanto os grupos PE e PO apresentaram um aumento da ativação de p38MAPK após 10 dias e na secreção de IL-6 e IL-8 (nos dias 10 e 18 dias de tratamento). ADSC tratadas com PO apresentaram uma diminuição do potencial de membrana e aumento da biomassa mitocondrial, associados à diminuição da função mitocondrial. O grupo PO apresentou diminuição da atividade metabólica e redução do consumo de oxigênio relacionado à respiração basal. Houve aumento do acúmulo de gotas lipídicas na condição tratada com PO.

## **CONCLUSÕES**

Nossos dados sugerem que o ambiente inflamatório observado na obesidade induz um fenótipo senescente através da indução de SASP via eixo p38MAPK/NF- $\kappa$ B. Além disso, esse fenótipo disfuncional parece estar associado a um comprometimento da homeostase e ciclo de vida mitocondrial. Por fim, o acúmulo de gotas lipídicas é sugestivo de um mecanismo celular adaptativo frente a um estímulo pró-inflamatório, característico da obesidade.

## **APOIO FINANCEIRO**

CAPES, CNPq, FAPERGS, PUCRS, UFRGS.

**PALAVRAS-CHAVE**

Células tronco adipo-derivadas, senescência celular, obesidade, metainflammatória, inflamação crônica, mitocôndria

**REFERÊNCIAS**

- BARBÉ-TUANA, Florencia et al. The interplay between immunosenescence and age-related diseases. *Seminars in immunopathology*, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 545–557, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32747977/>. Acesso em: 5 mar. 2023.
- FRANCESCHI, Claudio et al. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2018. Disponível em: Acesso em: 11 fev. 2020.
- FRASCA, Daniela; BLOMBERG, Bonnie B.; PAGANELLI, Roberto. Aging, obesity, and inflammatory age-related diseases. *Frontiers in Immunology*, [s. l.], v. 8, n. DEC, p. 1745, 2017. Disponível em: Acesso em: 18 fev. 2022.
- MANGUM, Lauren H. et al. Tissue Source and Cell Expansion Condition Influence Phenotypic Changes of Adipose-Derived Stem Cells. *Stem cells international*, [s. l.], v. 2017, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29138638/>. Acesso em: 5 mar. 2023.
- SUN, Xuerong et al. IL-1 $\alpha$  inhibits proliferation and adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells through NF- $\kappa$ B- and ERK1/2- mediated proinflammatory cytokines. *Cell biology international*, [s. l.], v. 42, n. 7, p. 794–803, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cbin.10932>. Acesso em: 24 jan. 2022.
- ZHU, Xiang-Yang et al. Functional Plasticity of Adipose-Derived Stromal Cells During Development of Obesity. *Stem Cells Translational Medicine*, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 893–900, 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/stcltm/article/5/7/893/6397824>. Acesso em: 24 jan. 2022.

**COMUNIDADES MICROBIANAS DE UMA TURFEIRA DA RPPN PRÓ-MATA**

**Natália Miguel Silveira<sup>1</sup>, Renata Medina da Silva<sup>1</sup>, Laura Roberta Pinto Utz<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Ecologia Aquática, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil.

**INTRODUÇÃO**

Turfeiras são agentes importante no ciclo do carbono (Etto et al., 2012). É estimado que sejam responsáveis pelo armazenamento de 30% do carbono terrestre mundial (Bispo et al., 2016). Em virtude de seu alto armazenamento de carbono e a emissão de gases relacionados ao efeito estufa, como o metano, turfeiras também apresentam um grande papel na regulação do clima mundial (Minasny et al., 2019). A microbiota de turfeiras tropicais ainda é pouco estudada, especialmente devido a pesquisas nos trópicos terem como foco principal a emissão de gases estufa por esses ambientes (Liu et al., 2020). Dessa forma, pesquisas com foco na microbiota de turfeiras no hemisfério sul são incomuns. No Brasil poucos estudos focam na microbiota das turfeiras (Etto et al., 2022).

**OBJETIVOS**

Esse trabalho tem como objetivo caracterizar comunidades microbianas de turfeiras da CPCN Pró-Mata por intermédio de sequências de DNA identificadoras (genes dos RNAs 18s e 16s).

**MATERIAIS E MÉTODOS**

Amostras de água de duas turfeiras foram coletadas em março de 2022 do Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza (CPCN) Pró-Mata, São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil. Em cada turfeira escolhida foram realizadas coletas em 5 pontos com um espaçamento de aproximadamente 20 m entre eles. De cada ponto 250 mL de água foram coletados. Medidas de pH, temperatura e oxigênio dissolvido das amostras foram realizados em campo. Em laboratório as amostras de água foram filtradas com bomba a vácuo usando membranas de acetato de celulose 0,22  $\mu$ m. Tudo que ficou retido na membrana foi separado para extração do DNA. A extração foi realizada com DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado utilizando NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), e após, enviado

para o laboratório Integrated Microbiome Resources (IMR, Canadá), onde está sendo realizado o sequenciamento através da plataforma Illumina MiSeq.

As sequências de 16s já geradas de uma das turfeiras foram importadas para o software Quantitative Insight Into Microbial Ecology (QIIME2 versão 2022.11). Em seguida foram limpas utilizando a função denoise da ferramenta DADA2, específica para sequências de amplicon illumina, onde os primers e químeras foram removidos, assim como sequências com menos de 200 pb e foi realizado o trimming de regiões nas sequências com um Phread quality score < 20. Após, uma análise de rarefação foi realizada para determinar suficiência amostral. As sequências limpas foram organizadas em uma matriz de variantes de sequência de amplicon (do inglês “Amplicon Sequence Variants” - ASVs), a partir da qual foi realizada a identificação taxonômica utilizando o banco de dados SILVA v138 e análises de diversidade.

Futuramente sequências de turfeiras tropicais e temperadas do hemisfério sul disponíveis em bancos de dados como o National Center for Biotechnology Information (NCBI) e Qiita (plataforma de gestão de estudos microbianos open- source) serão implementadas ao nosso grupo de amostras.

### **RESULTADOS**

Atualmente, apenas dados referentes aos procariotos das 5 amostras de uma das turfeiras amostradas foram retornados do sequenciamento e inicialmente analisados. O gráfico de rarefação gerado após limpeza das sequências revelou suficiência amostral.

Análises de diversidade alfa iniciais indicaram que a amostra retirada do ponto com maior temperatura (20,5°C) apresentou a menor diversidade (índice de Shannon e observed features) e equitabilidade (evenness).

A identificação taxonômica revelou a presença de 462 filós, 459 classes e 432 famílias de um total de 463 identificações (460 bactérias e 3 arqueias). Destas, os filós bacterianos Proteobacteria e Verrucomicrobiota foram os que apresentaram maior abundância nas amostras. As classes Gammaproteobacteria (com a família Comamonadaceae), Alphaproteobacteria (Acetobacteraceae) e Verrucomicrobiae (Pedosphaeracea) apareceram como as mais abundantes, nessa ordem, em todas as amostras. Estes grupos de bactérias são amplamente diversos, sendo os únicos que contém as bactérias metanotróficas conhecidas. Apenas duas linhagens de Archaea foram detectadas, uma do filo Nanoarchaeota, da ordem Woeseearchaeales

e a outra do filo Micrarchaeota, da ordem Micrarchaeales. A primeira é de um taxon de espécies anaeróbias descritas como tendo uma potencial relação sintrófica com espécies metanogênicas, com indícios de que podem impactar a metanogênese em ecossistemas aquáticos continentais, como turfeiras (Liu et al., 2018). As espécies de Micrarchaeales são conhecidas por serem versáteis metabolicamente, envolvidas na produção e metano em digestores anaeróbios (Owusu-Agyeman et al., 2021), além de encontradas ambientes hostis, como drenagem ácida de minas, ambientes hipersalinos e turfeiras (Chen et al., 2018).

### **CONCLUSÕES**

Esse trabalho é o primeiro a caracterizar a microbiota de turfeiras do Rio Grande do Sul. Os resultados iniciais da composição de procariotos da turfeira da RPPN Pró-Mata estão de acordo com o encontrado na literatura para outras turfeiras tropicais, com dominância de Proteobacteria e a alta frequência da família Acetobacteraceae. Mais análises são necessárias para caracterizar estas comunidades.

### **APOIO FINANCEIRO**

O projeto faz parte do Projeto “PELD Pró-Mata”, no subprojeto “Pró-Mata eDNA”, que obteve verba do edital “Programa de Pesquisa Ecológica de Longa Duração” de 2020 (CNPq-FAPERGS). Ainda, conta com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil (CAPES). De forma complementar o projeto também poderá contar com recursos do PROEX do PPG BCM-PUCRS.

### **PALAVRAS-CHAVE**

Microbiologia, metabarcoding, ecologia microbiana, metabolismo microbiano

### **REFERÊNCIAS**

BISPO, D. F. A. et al. Hydrology and carbon dynamics of tropical peatlands from Southeast Brazil. CATENA, v. 143, p. 18–25, ago. 2016.

CHEN, L.-X. et al. Metabolic versatility of small archaea Micrarchaeota and Parvarchaeota. *The ISME Journal*, v. 12, n. 3, p. 756–775, 8 dez. 2017.

ETTO, R. M. et al. Prokaryotic communities of acidic peatlands from the southern Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 661–674, jun. 2012.

ETTO, R. M. et al. Influence of environmental factors on the tropical peatlands diazotrophic communities from the Southern Brazilian Atlantic Rain Forest. *Letters in Applied Microbiology*, v. 74, n. 4, p. 543–554, 1 abr. 2022.

LIU, B. et al. The microbial diversity and structure in peatland forest in Indonesia. *Soil Use and Management*, v. 36, n. 1, p. 123–138, 14 nov. 2019.

LIU, X. et al. Insights into the ecology, evolution, and metabolism of the widespread Woese archaeal lineages. *Microbiome*, v. 6, n. 1, 8 jun. 2018.

MINASNY, B. et al. Digital mapping of peatlands – A critical review. *Earth-Science Reviews*, v. 196, p. 102870, set. 2019.

OWUSU-AGYEMAN, I.; PLAZA, E.; CETECIOGLU, Z. A pilot-scale study of granule-based anaerobic reactors for biogas recovery from municipal wastewater under sub-mesophilic conditions. *Bioresource Technology*, v. 337, p. 125431, out. 2021.

## **EOTAXINA-1/ CCL11 PROMOVE SENESCÊNCIA CELULAR EM FIBROBLASTOS PULMONARES VIA MECANISMOS PRÓ-OXIDANTES, PRÓ-INFLAMATÓRIOS E DE RESPOSTA DE DANO AO DNA**

**Patrícia Lavandoski<sup>1</sup>, Vinícius Pierdoná<sup>1</sup>, Rafael Moura Maurmann<sup>2</sup>, Lucas Kich Grun<sup>3</sup>, Fátima T. C. R. Guma<sup>1</sup>, Florencia María Barbé-Tuana<sup>2,3</sup>.**

*1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90035-003, Brasil.*

*2 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90619-900, Brasil.*

*3 Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde de Criança da Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90619-900, Brasil.*

### **INTRODUÇÃO**

A Eotaxina-1/ CC motif chemokine ligand 11 (CCL11) é uma quimiocina importante na fisiopatologia da asma, atuando principalmente no recrutamento de eosinófilos para o pulmão (GARCIA-ZEPEDA et al., 1996). Nesse sentido, CCL11 é capaz de induzir a deposição de matriz extracelular no tecido pulmonar, contribuindo para o estabelecimento de um processo fibrótico que pode resultar em declínio funcional acelerado ou ainda na elevação da morbidade associada a doenças do trato respiratório (HUAUX et al., 2005). Evidências recentes sugerem, ainda, que o CCL11 exerce um papel importante sobre o envelhecimento, uma vez que se observou uma correlação positiva entre a idade cronológica e a concentração dessa molécula na circulação periférica (VILLEDIA et al., 2011). Ademais, um estudo prévio realizado pelo nosso grupo demonstrou um aumento na concentração de CCL11 no plasma de crianças com asma grave, bem como uma correlação inversa entre os níveis dessa quimiocina e o comprimento telomérico, um marcador central de envelhecimento a nível celular (BARBÉ-TUANA et al., 2021). Esses resultados sugerem que CCL11 poderia desempenhar um papel significativo na indução do envelhecimento precoce em crianças com asma. Porém, os mecanismos moleculares que determinam essa relação ainda não foram elucidados.

### **OBJETIVO**

Investigar se a exposição à CCL11 é capaz de induzir senescência celular em fibroblastos pulmonares e compreender os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo.

### **MÉTODOS**

As análises *in silico* foram realizadas através de um software próprio denominado PseudoCell para prever comportamentos celulares após estimulação com CCL11 e as ferramentas GEO2R e GO Consortium para análises de expressão gênica diferencial e de enriquecimento de via. Células da linhagem MRC5, derivadas de fibroblastos pulmonares embrionários humanos, foram tratadas com diferentes doses de CCL11 humano recombinante (CCL11) e quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da incubação com 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) por 4 e 24 horas. Para quantificação de  $\gamma$ H2AX, p-TP53 e Ki-67

intracelular as células foram tratadas com CCL11 (500ng/mL) por 2h e 24h e então incubadas com os respectivos anticorpos para aquisição em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II. A atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase associada a senescência (SA- $\beta$ -gal) foi avaliada através do substrato fluorescente 5-Dodecanoylamino fluorescein Di- $\beta$ -D- Galactopyranoside (C12FDG) também por citometria de fluxo. A detecção de citocinas inflamatórias no sobrenadante foi realizada após 24h por Cytometric Bead Array (CBA) e a quantificação de CCL11 foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA).

### **RESULTADOS**

As simulações *in silico* apontaram para o envolvimento de vias pró-oxidantes (CYBA, CYBB), pró-inflamatórias (IL6) e da maquinaria de resposta de dano ao DNA (H2AX, TP53) após a exposição à CCL11. Esse perfil foi confirmado *in vitro*, com o aumento dos níveis de espécies reativas do oxigênio ( $p < 0,05$ ) e a ativação das proteínas de resposta de dano ao DNA  $\gamma$ H2AX ( $p < 0,0001$ ) e p-TP53 ( $p < 0,0001$ ) após 2h de tratamento com CCL11. Além disso, CCL11 foi capaz de induzir senescência celular, conforme indicado pelo aumento da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase ( $p < 0,05$ ) e pela redução da capacidade proliferativa indicada pela redução na expressão de Ki-67 ( $p < 0,05$ ). Ademais foi observado um aumento na secreção endógena de CCL11 e das citocinas pró-inflamatórias IL6 e IL-8 ( $p < 0,001$ ), componentes centrais do fenótipo secretor associado a senescência. Finalmente, nossas análises de expressão diferencial demonstraram níveis aumentados de CCL11, NADPH Oxidase 1 (NOX1), Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) e IL6, além das moléculas centrais ao envelhecimento celular como CDKN2A e SERPINE1, em células epiteliais pulmonares de pacientes portadores de asma (GSE18965).

### **CONCLUSÕES**

Estes achados fornecem novas evidências sobre o papel de CCL11 como fator indutor de envelhecimento celular e sugerem as vias moleculares envolvidas nesse processo. Compreender a ação de CCL11 no contexto do envelhecimento pode ter importantes implicações para o tratamento de doenças pulmonares.

### **APOIO FINANCEIRO**

CAPES, CNPQ, FAPERGS, PUCRS, UFRGS.

### **PALAVRAS-CHAVE**

CCL11, Eotaxina-1, Envelhecimento, senescência, asma

### **REFERÊNCIAS**

- BARBÉ-TUANA, Florencia M. et al. Shorter telomeres in children with severe asthma, an indicative of accelerated aging. *Aging* (Albany NY), [s. l.], v. 13, n. 2, p. 1686, 2021.
- GARCIA-ZEPEDA, Eduardo A. et al. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nature medicine*, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 449–456, 1996.
- HUAUX, Francois et al. Role of Eotaxin-1 (CCL11) and CC Chemokine Receptor 3 (CCR3) in Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, [s. l.], v. 167, n. 6, p. 1485–1496, 2005.
- VILLEDA, Saul A. et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, [s. l.], v. 477, n. 7362, p. 90–96, 2011.

## **AVALIAÇÃO DA ADENOSINA E DA INOSINA NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE ESÔFAGO**

**1,2,3Silveira L.H., 1,2Cappellari A.R., 1,3Rockenbah L., 1,2,3 Morrone F.B.**

1 Laboratório de Farmacologia Aplicada, Escola de Ciências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

2 Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Escola de Ciências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

3 Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Escola de Medicina, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

## **INTRODUÇÃO**

O câncer de esôfago é o nono câncer mais diagnosticado no mundo e a sexta causa mais comum de morte relacionada ao câncer<sup>2</sup>. A sinalização purinérgica está relacionada com o desenvolvimento de tumores, incluindo tumores esofágicos<sup>3</sup>. Além disso, a sinalização purinérgica tem um efeito considerável na progressão do tumor, impactando o microambiente tumoral e a resposta imune. Durante o crescimento do tumor, o ATP (trifosfato de adenosina) e seus metabólitos são ativamente secretados no ambiente extracelular, onde atuam como mensageiros extracelulares<sup>1</sup>.

## **OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo foi avaliar a via adenosina desaminase/CD26 na proliferação e progressão de células cancerígenas de esôfago.

## **MÉTODOS/METODOLOGIA**

Para avaliar a proliferação celular, foram utilizados protocolos de determinação de viabilidade celular, MTT e tratamos as células com adenosina nas concentrações de 0,1, 1 e 5 mM por 24 e 48 h. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob o número 4.768.504.

## **RESULTADOS**

Para os experimentos, utilizamos as células representativas dos subtipos de adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas, OE21 e OE33, respectivamente. Observamos que a adenosina promoveu uma redução significativa na proliferação celular nas concentrações de 1 e 5 mM após 24h e 48h de tratamento para a linhagem celular OE21. Por outro lado, observamos que a adenosina na concentração de 0,1 mM foi capaz de promover um aumento na viabilidade celular após 48h de tratamento na linhagem celular OE33. Além disso, na linhagem celular OE33, a adenosina em concentrações mais elevadas (1 e 5 mM) promoveu uma redução na proliferação celular. Dois subtipos de linhagens, OE33 (adenocarcinoma) e Kyse-450 (carcinoma de células escamosas) foram usados para avaliar os efeitos da inosina. As células foram tratadas com inosina nas concentrações de 0,1, 1 e 5 mM por 24h e 4 h. O ensaio MTT foi usado para determinar a viabilidade celular. Os resultados mostraram que a inosina promoveu uma redução significativa na viabilidade celular na concentração de 5 mM após 48 h de tratamento. Além disso, uma redução na viabilidade celular na concentração de 5 mM após 24 h de tratamento para a linha celular Kyse-450. Os demais tratamentos não induziram redução na proliferação das linhagens celulares Kyse-450 e OE33.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com a investigação da via da adenosina deaminase/CD26 na proliferação das diferentes células foi observado que a adenosina promoveu uma significativa redução da proliferação celular nas concentrações de 1 e 5 mM após 24h e 48h de tratamento para a linhagem de carcinoma de células escamosas. Já para a linhagem representativa de adenocarcinoma, foi possível observar que a adenosina promoveu o aumento na viabilidade celular na concentração de 0,1 mM após 48 h. Também na linhagem de adenocarcinoma, as concentrações mais elevadas de adenosina promoveram redução da proliferação celular. Como na via final de metabolismo extracelular dos nucleotídeos, a adenosina pode ser degradada por ação da enzima adenosina deaminase (ADA), nós avaliamos a ação da inosina na viabilidade celular em linhagens de câncer de esôfago. Como resultado, observamos, inicialmente, que a inosina promoveu uma significativa redução da proliferação celular na concentração de 5 mM após 48h do tratamento, e uma redução da proliferação celular na concentração de 5mM após 24 h do tratamento na linhagem Kyse-450. Esses resultados sugerem que o tratamento com inosina pode reduzir a proliferação de carcinoma de células escamosas (ESCC) quando esse nucleotídeo foi administrado em alta concentração (5mM). Deste modo, este trabalho mostra a participação da via da adenosina deaminase/CD26 na proliferação de células de câncer de esôfago (OE21, Kyse-450 e OE33).

**APOIO FINANCEIRO**

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001, e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, FAPERGS, PqG 02/2017 (bolsa número 17/ 2551-0001016-7).

**PALAVRAS-CHAVE**

câncer de esôfago; sistema purinérgico; adenosina; inosina; via da adenosina deaminase/CD26; proliferação celular.

**REFERÊNCIAS**

- Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* v. 87 (2) p. 659-797, 2006.
- GLOBOCAN. Estimated cancer incidence, mortality, prevalence and mortality worldwide in 2020. Globocan. 2020. Disponível em: < <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-factsheets.pdf> >.
- Santos AA, Cappellari AR, de Marchi FO, Gehring MP, Zaparte A, Brandão CA, Lopes TG, Silva VD, Pinto LFR, Savio LEB, Souza ACAM, Silva RC, Pancez JD, Zerbini LF, Morrone FB. Potential role of P2X7R in esophageal squamous cell carcinoma proliferation. *Purinergic Signal.* v. 13 (3) p. 279- 292, 2017. doi: 10.1007/s11302-017-9559-2.

**PRODUÇÃO DE DANO AO DNA FRENTE ESTÍMULO COM CCL11 É MEDIADO POR ESTRESSE OXIDATIVO**

**Vinicius Pierdoná1, Patrícia Lavandoski1, Rafael Moura Maurmann2, Guilherme Antônio Borges3,4, Jose Carlos Merino Mombach5, Fatima Theresinha Costa Rodrigues Guma1 and Florencia María Barbé-Tuana6,7**

*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90035-003, Brasil.*

*College of Health Sciences, University of Memphis, Memphis, TN38152, USA*

*Departamento de Engenharia Electrotécnica e de Computadores, Universidade de Coimbra, Coimbra, 3030-290, Portugal*

*Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão - Instituto Federal Sul-rio- grandense, Campus Charqueadas, Rio Grande do Sul, 96745-000, Brasil*

*Departamento de Física, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil*

*Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90619-900, Brasil.*

*Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde de Criança da Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90619-900, Brasil.*

**INTRODUÇÃO**

A asma alérgica é uma doença inflamatória complexa e heterogênea das vias aéreas em que a secreção de citocinas mediada por eosinófilos desempenha um papel crítico. Dessas, a secreção de C-C molecule Motif Chemokine Ligand 11 (CCL11, eotaxina-1) se destaca por se associar a muitos dos fenômenos celulares observados nessa condição, como o recrutamento de eosinófilos (Park et al., 2017; Sallusto et al., 1997). Em um espectro mais amplo, CCL11 também parece agir no processo de senescência celular como um fator de envelhecimento (Villeda et al., 2011). Evidências corroboram a associação de CCL11 com o envelhecimento, demonstrando uma correlação positiva entre idade cronológica e o aumento circulante dessa molécula no sangue periféricos de indivíduos sadios (Hoefler et al., 2017). Essa relação parece ser central na compreensão das dinâmicas que opõem a asma grave, ou refratária, à asma responsiva a tratamento. Em indivíduos portadores de asma refratária, mas não naqueles responsivos a tratamento, os níveis de CCL11 circulantes no sangue periférico estão negativamente correlacionados com o comprimento telomérico, um importante marcador de envelhecimento celular (Barbé-Tuana et al., 2021). Apesar disso, pouco se sabe sobre os eventos moleculares e intracelulares que explicam a associação dessa quimiocina com o envelhecimento celular.

**OBJETIVOS**

Nesse trabalho, procuramos elencar possíveis mecanismos moleculares que possam explicar as diferenças no envelhecimento biológico entre indivíduos portadores de asma grave e responsiva a tratamento.



## **MÉTODOS**

Com o auxílio da ferramenta de simulação e modelagem lógica PseudoCell, determinou-se *in silico* os elementos moleculares que poderiam estar modulados no estímulo celular com diferentes concentrações de CCL11. Ainda, realizou-se as análises da ativação diferencial desses elementos, bem como de enriquecimento de via a partir dos nós que tiveram sua ativação exclusivamente modulada nos grupos de maiores concentrações. Essas análises foram realizadas em linguagem R, com o auxílio dos pacotes limma e clusterProfiler (Wu et al., 2021; Yu et al., 2012; Ritchie et al., 2015). Ademais, a fim de determinar uma possível relação causal entre a produção de estresse oxidativo mediada pelo estímulo por CCL11 e a formação de dano ao DNA silenciou-se, com auxílio da ferramenta PseudoCell, o gene para CYBB e analisou-se a alteração no perfil de ativação dos elementos da rede frente a estímulos com CCL11. Por fim, a fim de validar os achados *in silico*, células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram incubadas com CCL11 em concentrações crescentes na presença ou não de N-acetilcisteína (NAC), avaliando-se a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da reação com 2',7' diacetato de diclorofluoresceína e detecção de proteínas fosforiladas por citometria de fluxo.

## **RESULTADOS**

A partir das análises *in silico*, nós elencamos 36 elementos moleculares, entre genes, proteínas e metabólitos, como diferencialmente modulados, exclusivamente, nas maiores frequências de estímulo por CCL11 ( $p < 0.01$ ). Interessantemente, esses elementos compreenderam principalmente vias associadas à regulação da produção de estresse oxidativo, ao reparo e percepção de dano ao DNA e a morte celular ( $p < 0.01$ ). Ademais, o silenciamento *in silico* de CYBB, um importante elemento na via de produção de estresse oxidativo, frente ao estímulo com CCL11 reverteu a ativação de elementos associados ao dano ao DNA na rede, indicando uma possível relação de causalidade entre os dois fenômenos. Esse perfil também foi validado *in vitro*, ao verificar-se o aumento dose-dependente na produção de ROS em PBMC no estímulo com CCL11 ( $p < 0,0001$ ), e fosforilação de proteínas de resposta de dano ao DNA ( $p < 0,05$ ), parcialmente revertidos com NAC.

## **CONCLUSÃO**

Os achados descritos nesse trabalho sugerem que a produção de dano ao DNA mediada pela sinalização por CCL11, especialmente em concentrações altas, é dependente de estresse oxidativo. Esses resultados podem auxiliar na compreensão do envelhecimento diferencial observado em condições onde essa molécula tem papel central.

## **APOIO FINANCEIRO**

CAPES, CNPQ, FAPERGS, PUCRS, UFRGS.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Asma, dano ao DNA, estresse oxidativo, CCL11, envelhecimento, senescência.

## **REFERÊNCIAS**

- PARK, J. Y. et al. CCL11 promotes angiogenic activity by activating the PI3K/Akt pathway in HUVECs. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, v. 37, n. 4, p. 416-421, 2017. DOI: 10.1080/10799893.2017.1298132.
- SALLUSTO, F.; MACKAY, C. R.; LANZAVECCHIA, A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science (New York, N.Y.)*, v. 277, n. 5334, p. 2005-2007, 1997. DOI: 10.1126/SCIENCE.277.5334.2005.
- VILLEDA, S. A. et al. The aging systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, v. 477, n. 7362, p. 90, 2011. DOI: 10.1038/NATURE10357.
- HOEFER, J. et al. The “aging factor” eotaxin-1 (CCL11) is detectable in transfusion blood products and increases with the donor’s age. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 9, 2017. DOI: 10.3389/FNAGI.2017.00402/FULL.
- BARBÉ-TUANA, F. M. et al. Shorter telomeres in children with severe asthma, an indicative of accelerated aging. *Aging (Albany NY)*, v. 13, n. 2, p. 1686, 2021. DOI: 10.18632/AGING.202527.
- WU, T. et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*, v. 2, n. 3, p. 100141, 2021. DOI: 10.1016/j.xinn.2021.100141.
- YU, G. et al. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, v. 16, n. 5, p. 284-287, 2012. DOI: 10.1089/OMI.2011.0118/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE1.JPEG.

Ritchie, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA- sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 7, p. e47-e47, 2015. DOI: 10.1093/NAR/GKV007.

## **PSEUDOCELL: UMA NOVA FERRAMENTA PARA A SIMULAÇÃO DE DINÂMICAS MOLECULARES EM SISTEMAS CELULARES**

**Vinicius Pierdoná1, Patrícia Lavandoski1, Rafael Moura Maurmann2, Guilherme Antônio Borges3,4, Jose Carlos Merino Mombach5, Fatima Theresinha Costa Rodrigues Guma1 and Florencia María Barbé-Tuana6,7**

*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90035-003, Brasil.*

*College of Health Sciences, University of Memphis, Memphis, TN38152, USA*

*Departamento de Engenharia Electrotécnica e de Computadores, Universidade de Coimbra, Coimbra, 3030-290, Portugal*

*Departamento de Ensino, Pesquisa e Extensão - Instituto Federal Sul-rio- grandense, Campus Charqueadas, Rio Grande do Sul, 96745-000, Brasil*

*Departamento de Física, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil*

*Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90619-900, Brasil.*

*Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde de Criança da Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90619-900, Brasil.*

### **INTRODUÇÃO**

Sistemas biológicos são caracterizados pela complexidade de suas interações e pela dinâmica de seus componentes. A fim de entender e prever o comportamento desses sistemas, é necessário um entendimento extenso de suas propriedades e dinâmicas em diferentes níveis de organização (Bizzarri et al., 2013; Mazzocchi, 2008). Nesse contexto, a modelagem computacional tem se mostrado útil, especialmente no que tange a previsão das respostas moleculares deflagradas frente a determinados estímulos ou condições. Dentre as possíveis estratégias para tanto, a construção de redes lógicas destaca-se como importante ferramenta na modelagem de condições patológicas (Saadatpour & Albert, 2013). Na construção de redes lógicas, os elementos moleculares e celulares envolvidos no fenômeno estudado, como proteínas, genes ou metabólitos, têm sua complexidade reduzida a nós. Ainda, as relações intermoleculares de ativação ou inibição que as entidades traçam entre si podem ser reduzidas a links ou arestas entre dois nós da rede. Dessa forma, cada link representa a abstração da relação de ativação ou inibição entre dois elementos da rede. Além disso, a fim de determinar a interação de ativação ou inibição entre nós, variáveis são atribuídas a cada elemento da rede, representando seu estado de ativação em um determinado momento. Finalmente, as dinâmicas que governam esses nós são descritas na forma de regras lógicas (Saadatpour & Albert, 2013). Nesse sentido, a construção de redes lógicas pode permitir a simulação dos comportamentos celulares frente a determinados distúrbios. Neste trabalho, apresentamos PseudoCell, uma ferramenta de código aberto para simulação de sistemas biológicos, projetada para avaliar o comportamento de redes moleculares a partir da construção de redes lógicas.

### **OBJETIVOS**

Nesse trabalho, objetivamos propor e validar uma nova ferramenta na simulação in silico de redes lógicas para o estudo de sistemas biológicos complexos.

### **MÉTODOS**

A ferramenta foi desenvolvida em linguagem Java com auxílio da literatura na determinação das regras lógicas que compõem a rede embarcada. Nela, o estado de um nó qualquer  $n$  foi definido por uma variável numérica e assumiu valores no intervalo  $[0, \text{Max}n]$ , onde  $\text{Max}n$  era o valor máximo para aquele determinado elemento. Ainda, a fim de garantir um caráter assíncrono, definiu-se que os nós fossem atualizados em ordem aleatória a cada rodada de atualização. Por fim, a fim de validar a capacidade preditiva da ferramenta foi avaliada a frequência de ativação de nós associados às vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK14 frente estímulo do nó CCL11 em frequências crescentes. Os achados encontrados foram, então, comparados com aqueles esperados pela literatura.

## **RESULTADOS**

PseudoCell é uma ferramenta de simulação e rede regulatória que permite aos usuários a avaliação *in silico* de alterações moleculares e celulares em resposta a perturbações ou estímulos a um determinado elemento específico ao longo do tempo. Atualmente, a rede embarcada na ferramenta consiste em 572 nós, divididos entre 527 genes, proteínas e desfechos celulares e 45 metabólitos, conectados por 1.179 arestas direcionais positivas (ativação) e negativas (inibição). A ferramenta é organizada em três módulos centrais. O módulo principal é responsável por lidar com as regras lógicas que governam o comportamento da rede biológica. O módulo de interface do usuário recebe e processa as condições experimentais e as configurações de simulação determinadas pelo usuário, incluindo o número de vezes que a rede será atualizada em cada simulação, o número de vezes que a simulação será repetida, os estímulos de ativação da rede ou o silenciamento de qualquer um de seus elementos. Ainda, permite ao usuário definir as informações referentes a qualquer nó da rede, incluindo as suas regras lógicas, ou a adição de novos nós e regras. Isso permite a expansão do escopo da rede original. Por fim, o módulo de exportação/importação garante a persistência dos dados e permite que o usuário compartilhe suas redes com a comunidade ou incorpore as redes criadas pela comunidade em seus próprios experimentos.

A fim de validar a ferramenta, verificamos a modulação das vias PI3K/AKT e MAPK14 frente perturbações do nó CCL11 e comparamos com os dados encontrados na literatura. Aqui, observamos um aumento dose-dependente nos nós PI3K, AKT, ERK1, ERK2 e MAPK14. Esses achados estão em linha com o que é observado na literatura, onde, após estimulação com CCL11 em diferentes tipos de células, ocorre um aumento na expressão ou fosforilação dessas moléculas (Badewa & Heiman, 2003; Kampen et al., 2000; Mishra et al., 2005).

## **CONCLUSÃO**

A PseudoCell é uma ferramenta promissora para a simulação *in silico* de sistemas biológicos e a avaliação de respostas moleculares em resposta a determinados estímulos.

## **APOIO FINANCEIRO**

CAPES, CNPQ, FAPERGS, PUCRS, UFRGS.

## **PALAVRAS-CHAVE**

redes lógicas, biologia de sistemas, modelagem computacional, modelagem lógica, bioinformática.

## **REFERÊNCIAS**

- BIZZARRI, M.; PALOMBO, A.; CUCINA, A. Theoretical aspects of Systems Biology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 112, n. 1-2, p. 33-43, 2013. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2013.03.019.
- MAZZOCCHI, F. Complexity in biology. Exceeding the limits of reductionism and determinism using complexity theory. *EMBO Reports*, v. 9, n. 1, p. 10, 2008. DOI: 10.1038/SJ.EMBOR.7401147.
- SAADATPOUR, A.; ALBERT, R. Boolean modeling of biological regulatory networks: A methodology tutorial. *Methods*, v. 62, n. 1, p. 3-12, 2013. DOI: 10.1016/J.YMETH.2012.10.012.
- BADEWA, A. P.; HEIMAN, A. S. Inhibition of CCL11, CCL24, and CCL26-induced degranulation in HL-60 eosinophilic cells by specific inhibitors of MEK1/MEK2, p38 MAP kinase, and PI 3-kinase. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 25, n. 2, p. 145-157, 2003. DOI: 10.1081/IPH-120020466.
- KAMPEN, G. T. et al. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood*, v. 95, n. 6, p. 1911-1917, 2000. DOI: 10.1182/BLOOD.V95.6.1911.
- MISHRA, R. K. et al. Differential dependence of eosinophil chemotactic responses on phosphoinositide 3-kinase (PI3K). *Allergy*, v. 60, n. 9, p. 1204-1207, 2005. DOI: 10.1111/J.1398-9995.2005.00845.X.

## **ENVOLVIMENTO DA ECTO-5'-NUCLEOTIDASE/CD73 NA MORTE INDUZIDA POR TRAIL e CURCUMINA EM CÂNCER DE BEXIGA**

**Liliana Rockenbach**

*Programa de pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde PUCRS.*

### **INTRODUÇÃO**

O carcinoma de células transicionais da bexiga (CCT) corresponde a cerca de 90% dos casos de câncer de bexiga, caracterizando-se como a principal neoplasia urotelial. Apesar da maioria dos diagnósticos ocorrerem no estágio inicial da doença, com os pacientes sendo tratados por ressecção transuretral seguida da instilação de BCG (Calmette-Guerin) combinada ou não com quimioterapia, trata-se de uma doença altamente recorrente, com risco de progressão e morte. Por isso, é necessário o monitoramento frequente dos pacientes e por longo prazo, como consequência, somado ao risco de vida dos pacientes essa patologia representa um alto custo para os sistemas de saúde no mundo. A identificação de novos alvos terapêuticos com consequente desenvolvimento de tratamentos mais eficientes no combate à recorrência e progressão, é alvo de diversos estudos. A ecto-5'-nucleotidase/CD73 (CD73), é uma enzima do sistema purinérgico que catalisa a hidrólise de AMP até adenosina, sendo a principal fonte de adenosina no meio extracelular. A relação dessa proteína transmembrana com diversos tipos de câncer vem sendo amplamente descrita, no CCT tal relação foi comprovada tanto in vitro (cultura de linhagens celulares) quanto in vivo (camundongos). Nossos estudos prévios mostram que a CD73 tem sua expressão e atividade aumentadas na medida em que o câncer de bexiga progride. O TRAIL (fator de necrose tumoral ligante indutor de apoptose) participa da ação do BCG, ao ativar seus receptores (DR4/DR5), ele induz seletivamente às células de câncer à morte, sem efeitos nas células saudáveis que não expressam DR4/DR5. Contudo, estudos já demonstraram que células de leucemia com alta expressão de CD73 são resistentes ao TRAIL. Já a curcumina é um composto natural cujos efeitos antiproliferativos sobre o câncer de bexiga já foram descritos.

### **OBJETIVO**

Em vista das informações expostas, o presente trabalho de pesquisa tem como objetivo investigar o possível envolvimento da CD73 na morte celular induzida por TRAIL somente ou em combinação com curcumina em linhagens de CB humano.

### **METODOLOGIA**

Para realização, foram utilizadas duas linhagens celulares: a T24 (CB grau III, resistente ao TRAIL) e a T24 com a enzima CD73 silenciada (5'KO). As linhagens foram cultivadas em meio DMEM com a adição de 10% de soro fetal bovino, sob condições ideais de temperatura e umidade. As linhagens foram semeadas em placas de 96 poços, tratadas por 24 horas com TRAIL 10, 50 e 100 ng/mL isolado ou em combinação com curcumina 10 ou 25 µM. Após o tratamento a proliferação celular foi avaliada pelo método indireto de MTT.

### **RESULTADOS**

Os resultados mostram um efeito sinérgico no tratamento conjunto com TRAIL e curcumina na supressão da proliferação das linhagens tumorais. Além disso, esse efeito é maior sobre a linhagem com CD73 silenciada, a 5'KO, o que não acontece quando as células são tratadas com TRAIL mais cisplatina, quimioterápico padrão. As células tratadas com TRAIL apresentaram uma leve diminuição na viabilidade celular apenas a partir da concentração de 100 ng/mL,  $70 \pm 13 \%$  para a T24 e  $72,7 \pm 5,8 \%$  para a 5'KO. As células tratadas apenas com curcumina 25 mM apresentaram viabilidade de  $60,8 \pm 4 \%$  e  $39,3 \pm 5,7 \%$  para T24 e 5'KO, respectivamente. Após o tratamento com TRAIL 10ng/mL em combinação com curcumina 25 mM as células T24 e 5'KO apresentaram viabilidade de  $28 \pm 1,8 \%$  e  $8,6 \pm 1,1$ , respectivamente. Já a cisplatina 2,5 mg/mL reduz a viabilidade de ambas as linhagens em cerca de 30%, e em combinação com TRAIL 10 ng/mL a T24 apresentou viabilidade de  $40,9 \pm 1,5 \%$  enquanto para a 5'KO este valor foi de  $58,7 \pm 10 \%$ .

### **CONCLUSÃO**

A curcumina sensibiliza as linhagens ao TRAIL, e nossos resultados sugerem a participação da CD73 no aumento dessa sensibilidade. Além disso, os resultados reforçam o potencial da CD73 como novo alvo terapêutico para tratamento adjuvante do CCT de bexiga.

### **APOIO FINANCEIRO**

Capes/FAPERGS, CNPQ.

### **PALAVRAS-CHAVE**

Câncer de bexiga; Sistema Purinérgico; TRAIL; Curcumina; Novos alvos terapêuticos.

## **AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA DI-HIDRONEOPTERINA ALDOLASE (EC 4.1.2.25) DE *Mycobacterium tuberculosis* POR NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE**

**Alexia de Matos Czczot<sup>1,2</sup>, Mauro Neves Muniz<sup>1</sup>, Marcia Alberton Perelló<sup>1</sup>, Pablo Machado<sup>1,2,3</sup>, Cristiano Valim Bizarro<sup>1,3</sup>, Luiz Augusto Basso<sup>1,2,3</sup>**

*<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil*

### **INTRODUÇÃO**

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa com altas taxas de incidência e mortalidade, cujo tratamento é longo com efeitos colaterais adversos que dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento. O desenvolvimento de novas estratégias contra TB é essencial para a erradicação dessa doença no mundo (WHO, 2022). A enzima di-hidroneopterina aldolase (DHNA) de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) destaca-se como um alvo molecular promissor para o desenvolvimento de novos fármacos anti-TB, uma vez que é essencial para a sobrevivência do bacilo e não há homólogos em humanos (Falcão et al., 2017). Compostos da classe 8-mercaptopguanina (8-MG) foram descritos como inibidores in vitro dessa enzima, porém não apresentaram atividade antimicobacteriana (Czczot et al., 2021). Sendo assim, a síntese de compostos com novos grupos funcionais representa uma etapa importante para um estudo mais aprofundado de relação estrutura-atividade dessa classe de compostos com essa enzima.

### **OBJETIVOS**

Identificar novas moléculas com atividade inibitória sobre a enzima di-hidroneopterina aldolase (EC 4.1.2.25) de *Mycobacterium tuberculosis*.

### **MÉTODOS**

A síntese dos compostos análogos do 8-MG foi realizada conforme metodologia já descrita (Czczot et al., 2021). Os compostos sintetizados foram avaliados quanto a sua atividade inibitória frente à enzima MtDHNA utilizando um método contínuo de atividade enzimática por espectrofluorimetria, monitorando por 6 minutos a conversão de 7,8-di-hidroneopterina (DHNp) a 6-hidroximetil-7,8-di-hidropterina (HP) catalisada pela MtDHNA, pelo aumento da fluorescência em 525 nm devido à formação de HP (Czczot et al., 2021). Para isso, foi realizada a determinação dos valores de IC<sub>50</sub> para todos os compostos e análise de inibição tempo-dependente nos tempos de pré-incubação da enzima com os compostos de 0, 5, 10, 20 e 40 minutos. Além disso, os perfis de inibição dos 5 compostos com os menores valores de IC<sub>50</sub> foram determinados por meio de ensaios de determinação da constante inibitória (K<sub>i</sub>). A concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos foi determinada frente à cepa laboratorial H37Rv de Mtb por meio do ensaio colorimétrico em microplaca de redução da resazurina (Giacobbo et al., 2017).

### **RESULTADOS**

Foram obtidos 16 compostos análogos do 8-MG por meio de síntese química. Todos os compostos apresentaram atividade inibitória contra a MtDHNA, com valores de IC<sub>50</sub> variando de 0,33 a 17,35 µM. Nenhum composto apresentou um perfil de inibição tempo-dependente nos 40 minutos de pré-incubação enzima/inibidor, sugerindo que a interação desses compostos com a enzima não ocorre lentamente. 4 compostos apresentaram perfil de inibição competitivo com o substrato DHNP, sugerindo que esses compostos se ligam apenas à enzima livre. As constantes de inibição do complexo enzima-inibidor (K<sub>i</sub>) para esses compostos variaram de 0,24 a 0,35 µM. Por outro lado, 1 composto apresentou perfil de inibição não-competitivo com DHNP, indicando que se liga tanto à enzima livre quanto ao complexo enzima-substrato. No entanto, como a constante de inibição do complexo enzima-inibidor foi inferior que a constante de inibição do complexo enzima-substrato-inibidor, provavelmente a inibição é mais eficiente quando o composto se liga à enzima livre. Todos os compostos foram avaliados quanto ao seu potencial de inibir o crescimento do Mtb, porém apenas um composto apresentou atividade inibitória com a maior concentração testada.

### **CONCLUSÕES**

Todos os análogos do 8-MG sintetizados apresentaram atividade inibitória contra a MtDHNA, porém a relação entre a estrutura e a atividade dos compostos poderá ser melhor compreendida com experimentos de docagem molecular, a qual permitirá uma melhor compreensão da interação dos grupos funcionais dos compostos com os resíduos da enzima.

### **APOIO FINANCEIRO**

CAPES, FAPERGS, BNDDES.

### **PALAVRAS-CHAVE**

Tuberculose, di-hidroneopterina aldolase, inibição enzimática.

### **REFERÊNCIAS**

- CZECZOT, A. M.; ROTH, C. D.; DUCATI, R. G.; PISSINATE, K. et al. 8-Mercaptoguanine-based inhibitors of Mycobacterium tuberculosis dihydroneopterin aldolase: synthesis, in vitro inhibition and docking studies. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 36, n. 1, p. 847-855, 2021.
- FALCÃO, V. C. et al. Validation of Mycobacterium tuberculosis dihydroneopterin aldolase as a molecular target for anti-tuberculosis drug development. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 485, n. 4, p. 814-819, 2017.
- GIACOBBO, B. C.; PISSINATE, K.; RODRIGUES-JUNIOR, V.; VILLELA, A. D. et al. New insights into the SAR and drug combination synergy of 2-(quinolin-4-yloxy)acetamides against Mycobacterium tuberculosis. *Eur J Med Chem*, 126, p. 491-501, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Tuberculosis Report, 2022.

## **AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA CURTA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ESTRELADAS IMORTALIZADAS (GRX)**

**Kétlin Fernanda Rodrigues<sup>1</sup>, Ana Flávia Bisogno Bervian<sup>1</sup>, Maria Cláudia Rosa Garcia<sup>1</sup>, Jarbas Rodrigues de Oliveira<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

### **INTRODUÇÃO:**

A fibrose hepática é uma condição caracterizada pelo acúmulo excessivo de proteínas da matriz extracelular (MEC) no fígado, levando à formação de tecido cicatricial. Isso ocorre como resultado de lesão hepática crônica e inflamação, que desencadeiam a ativação de células estreladas hepáticas (HSCs) e a subsequente produção de proteínas da MEC, como o colágeno. À medida que o processo fibrótico progride, o fígado torna-se cada vez mais rígido e disfuncional, levando à cirrose e à doença hepática terminal. As opções de tratamento para a

fibrose hepática são limitadas e o foco é principalmente abordar a causa subjacente da lesão e inflamação hepáticas. As células estreladas imortalizadas GRX são uma linhagem celular derivada de células estreladas hepáticas de camundongos, que foram imortalizadas através da introdução do gene SV40-T. Essa linhagem celular tem sido amplamente utilizada em estudos de pesquisa relacionados a doenças hepáticas, como a fibrose hepática. As células GRX são capazes de produzir e secretar grandes quantidades de proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno tipo I e a fibronectina, que são importantes mediadores da fibrose hepática, o que torna essa linhagem celular um modelo útil para estudos *in vitro* de ativação de células estreladas hepáticas e sua função na patogênese da fibrose hepática. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são um tipo de ácido graxo com cadeias de carbono de até seis átomos de comprimento. Eles são produzidos durante a fermentação bacteriana de carboidratos não absorvíveis no intestino grosso, como a fibra alimentar. Os principais tipos de AGCC são o acetato (C2), o propionato (C3) e o butirato (C4).

### **OBJETIVOS**

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito dos AGCC, acetato, propionato e butirato em diferentes concentrações, sobre a proliferação da linhagem de células estreladas imortalizadas (GRX).

### **MÉTODOS/METODOLOGIA**

As células foram mantidas em Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina/estreptomicina) a 1 %. Mantidas sob atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Em placas de cultura, as células foram inicialmente dispensadas e quando apresentaram aproximadamente 70% de confluência e mais de 95% de viabilidade no teste de exclusão com Azul de Tripán foram utilizadas para a avaliação da proliferação celular. Em uma placa de cultura celular de 24 poços as células foram dispensadas (3x10<sup>3</sup> células/poço) e pré-cultivadas por 24 horas a 37 °C em incubadora com atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. E então foram tratadas com diferentes concentrações dos ácidos graxos de cadeia curta 0,1, 1, 10 e 100 mM, e avaliadas após 72 horas. Além das drogas, foi estabelecido um controle negativo somente com meio de cultura suplementado a 5% com SFB e um controle positivo com a N-acetilcisteína (NAC) na concentração de 400 µg/mL. Após esse período o número de células viáveis foi determinado através da mistura de 25 µL de suspensão celular e 25 µL de solução a 0,4% de azul de tripan, utilizando um hemocítmetro e microscópio óptico. As células azuis que absorveram o corante foram contadas como células mortas e as que não absorveram o corante, células vivas.

### **RESULTADOS**

O experimento realizado mostrou que o controle negativo (NAC) teve uma redução significativa na diminuição da proliferação. Já nos tratamentos a concentração de 0,1 mM do tratamento acetato e propionato não se observou uma redução significativa, porém nessa mesma concentração o tratamento butirato demonstrou uma diminuição significativa. Já nas concentrações de 1 e 10 mM os tratamentos acetato e propionato demonstraram uma redução no número de células, porém o tratamento com butirato apenas demonstrou uma redução na concentração de 1 mM. O tratamento com acetato teve uma maior redução na concentração de 10 mM, seguido da concentração de 1 mM. Já o tratamento propionato teve uma redução significativa igual nessas concentrações. O tratamento butirato também apresentou uma diminuição na concentração de 1 mM e não apresentou nenhuma redução no crescimento celular na concentração de 10 mM. Já na concentração de 100 mM, todos os tratamentos testados se mostraram tóxicos para as células, não apresentando nenhum crescimento celular nessa concentração.

### **CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados preliminares encontrados neste estudo, demonstram que o controle positivo foi eficaz na redução crescimento das GRX, isso deve-se por essa droga já ser utilizada no tratamento de pacientes com um grau leve de fibrose hepática. Quanto aos tratamentos com as drogas testes, se observou que ambos AGCC testados (acetato, propionato e butirato), possuem um potencial na redução da proliferação celular da linhagem GRX em diferentes concentrações. Contudo, é necessário ainda mais experimentos para conseguir demonstrar suas rotas de ação para a redução da proliferação celular.

**REFERÊNCIAS:**

- Aydin MM, Akcali KC. Liver fibrosis. *Turkish J Gastroenterol.* 2018;29(1):14–21.
- Basso B de S. Avaliação do metoxieugenol e do extrato de *Baccharis anomala* DC. no tratamento de fibrose hepática. Porto Alegre; 2021. p. 80.
- Borojevic R, Monteiro ANA, Vinhas SA, Domont GB, Mourão PAS, Emonard H, et al. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *Vitr Cell Dev Biol.* 1985;21(7).
- Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. In: *Proceedings of the Nutrition Society.* 2014.

**APOIO FINANCEIRO**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

**PALAVRAS-CHAVE**

fibrose hepática, acetato, propionato, butirato, GRX.

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS ECTONUCLEOTIDASES EM NEOPLASIA DE ESÔFAGO**

**1,2 Salem M.C.G., 1,2,3 Silveira L.H., 1,2 Cappellari A.R., 1,3 Rockenbah L., 1,2,3 Morrone F.B.**

1 Laboratório de Farmacologia Aplicada, Escola de Ciências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

2 Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Escola de Ciências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

3 Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Escola de Medicina, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

**INTRODUÇÃO**

O câncer de esôfago é o oitavo câncer mais comumente diagnosticado no mundo, mais prevalente em homens, sendo a sexta causa mais comum de óbito relacionado a câncer (GLOBOCAN, 2018). A sinalização purinérgica tem considerável efeito sobre a progressão tumoral por impactar no microambiente tumoral e na resposta imune. Durante o crescimento tumoral, o ATP (adenosina trifosfato) e seus principais metabólitos, são ativamente secretados no ambiente extracelular, onde cumprem um papel fundamental como mensageiros extracelulares. As ectonucleotidases CD39 e CD73 agem de forma coordenada a fim de degradar o ATP e o AMP, respectivamente, para a produção extracelular de adenosina em diferentes tipos tumorais (Zaparte et al., 2020). Tendo em vista, a importância da sinalização purinérgica no desenvolvimento do câncer e o aumento dos casos diagnosticados com o câncer de esôfago na região sul do Brasil, é extremamente relevante estudar potenciais alvos farmacológicos e biomarcadores que poderão auxiliar no diagnóstico e no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para este tipo tumoral.

**OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade enzimática de ATP e ADP e AMP nas linhagens celulares de câncer de esôfago.

**MÉTODOS/METODOLOGIA**

A fim de avaliar o perfil de hidrólise dos nucleotídeos da adenina foram utilizadas duas linhagens de câncer de esôfago humano a OE33 (representativa de um adenocarcinoma de esôfago) e a linhagem OE21 (representativa de um carcinoma de células escamosas de esôfago). As células foram semeadas e mantidas sob condições ideais de cultivo até atingirem a confluência. Na sequência, as amostras foram incubadas e a atividade enzimática realizada conforme descrito por Cappellari et al., 2015. Os nucleotídeos foram utilizados na concentração de 1 mM (ATP e ADP) e 2 mM (AMP) e a quantificação de fosfato inorgânico liberado foi determinada conforme descrito por Chan et al., 1976. O nível da hidrólise dos nucleotídeos será determinado como nmol Pi / min / mg de Proteína.



## RESULTADOS

O perfil de hidrólise dos nucleotídeos da adenina foi avaliado nas duas linhagens aqui estudadas. De acordo com os resultados mostrados na Figura 1A, a linhagem OE21 hidrolisa preferencialmente o AMP apresentando baixa hidrólise dos nucleotídeos ATP e ADP. Já a linhagem OE33 (Figura 1B), mostrou um elevado perfil de hidrólise dos três nucleotídeos (ATP>ADP>AMP), sendo os níveis significativamente diferentes. Ao compararmos apenas a hidrólise do AMP entre as duas linhagens, vimos que a linhagem OE33, representativa de um adenocarcinoma de esôfago apresenta maiores níveis de hidrólise desse nucleotídeo em relação à linhagem OE21, representativa de um carcinoma de células escamosas de esôfago (Figura 1C).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados parciais mostraram as células tumorais estudadas apresentam o metabolismo extracelular dos nucleotídeos da adenina e houve diferença na hidrólise do AMP quando comparamos as duas linhagens. Por fim, estes resultados delineiam um importante papel para o metabolismo extracelular da adenosina na biologia das células de câncer de esôfago, caracterizando um importante futuro alvo terapêutico.

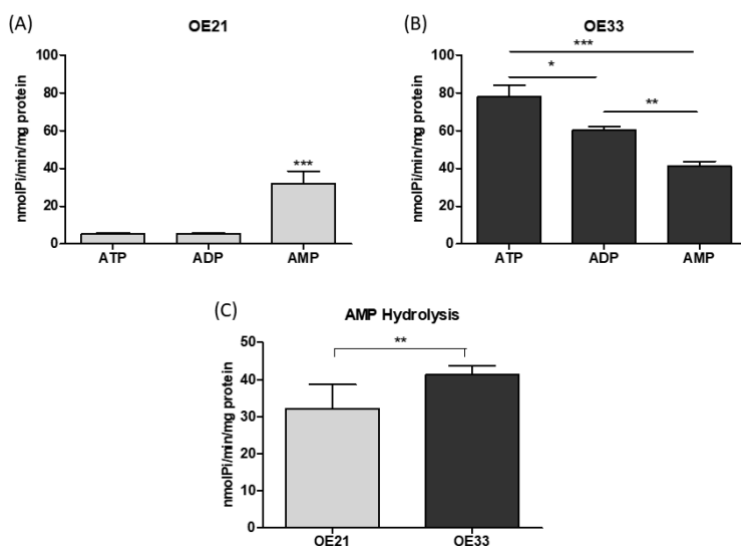
## APOIO FINANCEIRO

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001, e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, FAPERGS, PqG 02/2017 (bolsa número 17/ 2551-0001016-7).

## PALAVRAS-CHAVE

câncer de esôfago; sistema purinérgico; ectonucleotidasas; CD39; CD73

Figura 1 – Perfil de hidrólise dos nucleotídeos da adenina nas linhagens celulares de câncer de esôfago. (A) Linhagem OE21; (B) Linhagem OE33 e (C) Perfil comparativo de hidrólise do AMP entre as duas linhagens. Os dados são expressos em um n=3 e apresentados como média  $\pm$  erro padrão, onde \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01 e \*p<0.05.



## AVALIAÇÃO DA ADENOSINA E DA INOSINA NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE CÂNCER DE ESÔFAGO

1,2,3Silveira L.H., 1,2Cappellari A.R., 1,3Rockenbah L., 1,2,3 Morrone F.B.

1 Laboratório de Farmacologia Aplicada, Escola de Ciências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

2 Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Escola de Ciências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

3 Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Escola de Medicina, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

## **INTRODUÇÃO**

O câncer de esôfago é o nono câncer mais diagnosticado no mundo e a sexta causa mais comum de morte relacionada ao câncer<sup>2</sup>. A sinalização purinérgica está relacionada com o desenvolvimento de tumores, incluindo tumores esofágicos<sup>3</sup>. Além disso, a sinalização purinérgica tem um efeito considerável na progressão do tumor, impactando o microambiente tumoral e a resposta imune. Durante o crescimento do tumor, o ATP (trifosfato de adenosina) e seus metabólitos são ativamente secretados no ambiente extracelular, onde atuam como mensageiros extracelulares<sup>1</sup>.

## **OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo foi avaliar a via adenosina desaminase/CD26 na proliferação e progressão de células cancerígenas de esôfago.

Métodos/metodologia: Para avaliar a proliferação celular, foram utilizados protocolos de determinação de viabilidade celular, MTT e tratamos as células com adenosina nas concentrações de 0,1, 1 e 5 mM por 24 e 48 h. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob o número 4.768.504.

## **RESULTADOS**

Para os experimentos, utilizamos as células representativas dos subtipos de adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas, OE21 e OE33, respectivamente. Observamos que a adenosina promoveu uma redução significativa na proliferação celular nas concentrações de 1 e 5 mM após 24h e 48h de tratamento para a linhagem celular OE21. Por outro lado, observamos

que a adenosina na concentração de 0,1 mM foi capaz de promover um aumento na viabilidade celular após 48h de tratamento na linhagem celular OE33. Além disso, na linhagem celular OE33, a adenosina em concentrações mais elevadas (1 e 5 mM) promoveu uma redução na proliferação celular. Dois subtipos de linhagens, OE33 (adenocarcinoma) e Kyse-450 (carcinoma de células escamosas) foram usados para avaliar os efeitos da inosina. As células foram tratadas com inosina nas concentrações de 0,1, 1 e 5 mM por 24h e 4 h. O ensaio MTT foi usado para determinar a viabilidade celular. Os resultados mostraram que a inosina promoveu uma redução significativa na viabilidade celular na concentração de 5 mM após 48 h de tratamento. Além disso, uma redução na viabilidade celular na concentração de 5 mM após 24 h de tratamento para a linha celular Kyse-450. Os demais tratamentos não induziram redução na proliferação das linhagens celulares Kyse-450 e OE33.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Com a investigação da via da adenosina deaminase/CD26 na proliferação das diferentes células foi observado que a adenosina promoveu uma significativa redução da proliferação celular nas concentrações de 1 e 5 mM após 24h e 48h de tratamento para a linhagem de carcinoma de células escamosas. Já para a linhagem representativa de adenocarcinoma, foi possível observar que a adenosina promoveu o aumento na viabilidade celular na concentração de 0,1 mM após 48 h. Também na linhagem de adenocarcinoma, as concentrações mais elevadas de adenosina promoveram redução da proliferação celular. Como na via final de metabolismo extracelular dos nucleotídeos, a adenosina pode ser degradada por ação da enzima adenosina deaminase (ADA), nós avaliamos a ação da inosina na viabilidade celular em linhagens de câncer de esôfago. Como resultado, observamos, inicialmente, que a inosina promoveu uma significativa redução da proliferação celular na concentração de 5 mM após 48h do tratamento, e uma redução da proliferação celular na concentração de 5mM após 24 h do tratamento na linhagem Kyse-450. Esses resultados sugerem que o tratamento com inosina pode reduzir a proliferação de carcinoma de células escamosas (ESCC) quando esse nucleotídeo foi administrado em alta concentração (5mM). Deste modo, este trabalho mostra a participação da via da adenosina deaminase/CD26 na proliferação de células de câncer de esôfago (OE21, Kyse-450 e OE33).

**APOIO FINANCEIRO**

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001, e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul, FAPERGS, PqG 02/2017 (bolsa número 17/ 2551-0001016-7).

**PALAVRAS-CHAVE**

Câncer de esôfago; sistema purinérgico; adenosina; inosina; via da adenosina deaminase/CD26; proliferação celular.

**REFERÊNCIAS**

1. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* v. 87 (2) p. 659-797, 2006.
2. GLOBOCAN. Estimated cancer incidence, mortality, prevalence and mortality worldwide in 2020. Globocan. 2020. Disponível em: < <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf> >.
3. Santos AA, Cappellari AR, de Marchi FO, Gehring MP, Zaparte A, Brandão CA, Lopes TG, Silva VD, Pinto LFR, Savio LEB, Souza ACAM, Silva RC, Pაცეც JD, Zerbini LF, Morrone FB. Potential role of P2X7R in esophageal squamous cell carcinoma proliferation. *Purinergic Signal.* v. 13 (3) p. 279-292, 2017. doi: 10.1007/s11302-017-9559-2.

## **EFEITOS DA SOBRECARGA DE FERRO E DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE OS NÍVEIS DE LIPOCALINA-2 EM HIPOCAMPO DE RATOS: UM ESTUDO EXPLORATÓRIO**

**Maiara Priscila dos Passos, Betânia Souza de Freitas, Filipe Valvassori do Nascimento, Luiza Kleverston, Cristopher de Souza dos Santos, Nadja Schröder<sup>b,c</sup>, Elke Bromberg<sup>a,b</sup>**

*a* Laboratório de Neurobiologia e Desenvolvimento da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

*b* Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia e Medicina Translacional (INCT-TM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, Brasil

*c* Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

**INTRODUÇÃO**

É sabido que a sobrecarga de ferro no período neonatal está relacionada a diversos déficits cognitivos, e que o depósito desse metal ocorre seletiva e progressivamente com a idade, podendo representar um importante fator de risco para o desenvolvimento da neurodegeneração em seres humanos. Em animais adultos este acúmulo de ferro causa o aumento do estresse oxidativo, que contribui para a neuroinflamação e recrutamento de proteínas inflamatórias (SCHRÖDER et al., 2013). Recentemente, uma família de proteínas tem recebido atenção devido ao seu papel na homeostase do ferro. A proteína Lipocalina-2 (LCN2) tem seus níveis aumentados por disfunções metabólicas, como a obesidade e o diabetes, situações na qual parece exacerbar o estado inflamatório de vários órgãos e sistemas, entre os quais o Sistema Nervoso Central (SNC). Modelos animais de Doença de Alzheimer sugerem que níveis aumentados de LCN2 favorecem o acúmulo de ferro no hipocampo, enquanto estudos *in vitro* indicam que a LCN2 é capaz de ativar a via intrínseca da apoptose. Foi demonstrado que o receptor 24p3R da LCN2 localiza-se na superfície celular e está envolvido na sinalização dos efeitos biológicos da LCN2, incluindo apoptose, alterações morfológicas, migração celular e amplificação de respostas inflamatórias (JHA et al., 2015). Em alterações metabólicas como na obesidade e diabetes, observa-se elevação dos níveis de LCN2, que atua como um mediador inflamatório, exacerbando respostas anti ou pró-inflamatórias e interferindo em processos dos quais participa, como a manutenção da homeostase, migração e diferenciação celular (BHUSAL et al., 2019). JIN et al, (2020) demonstraram que a LCN2 periférica pode atravessar a barreira hematoencefálica e ativar respostas imunes, atuando como mediadora da resposta inflamatória periférica e cerebral, além de ser considerada como um biomarcador inflamatório para inflamação induzida pela obesidade (JIN et al., 2020).

**OBJETIVO**

Avaliar os efeitos do tratamento neonatal com ferro e de uma dieta hiperlipídica após o desmame, sobre os níveis de LCN2 e mecanismos de morte celular em hipocampo de ratos adultos.

## **MÉTODOS**

Filhotes machos de ratos Wistar (N=62) de 12 dias de idade receberam por via oral uma única dose diária (10 mL/kg de volume de solução) de veículo (5% de sorbitol em água; grupo controle) ou 30 mg/kg de peso corporal de Fe<sup>2+</sup> (carbonila de ferro, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) via gavagem, durante 3 dias (dias 12 a 14 pós-natal). Após o desmame, os animais do grupo veículo e tratamento com ferro foram divididos em dois subgrupos, que receberam dieta padrão (ração padrão ou hiperlipídica, artesanal e composta de 40% ração padrão, 25% leite em pó integral, 20 % de óleo de soja e 15% de xarope de milho. Assim, quatro grupos compuseram o delineamento experimental deste estudo: veículo + dieta padrão, veículo + dieta hiperlipídica, ferro + dieta padrão, ferro + dieta hiperlipídica. Aos nove meses de idade, os animais foram sacrificados por decapitação e os hipocampus foram rapidamente removidos para as análises moleculares, que incluíram: a expressão do gene da LCN2, do receptor 24p3r e da BIM (uma proteína pró-apoptótica) (Rt-PCR); os níveis proteicos de LCN2 e B-cell lymphoma 2 (BCL2, uma proteína anti-apoptótica) (Western Blot). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância de duas vias (2-way ANOVA). P<0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

## **RESULTADOS**

Neste estudo exploramos os efeitos da sobrecarga de ferro durante o período neonatal, a exposição a uma dieta hiperlipídica (HFD) ao longo da vida, ou a combinação destes dois fatores de risco, na expressão gênica hipocampal e nos níveis de LCN2, 24p3R e proteínas anti e pró-apoptóticas da família BCL2, nomeadamente BIM e BCL2, respetivamente. Os resultados indicam que a sobrecarga de ferro durante o período neonatal induziu um aumento significativo na expressão gênica de LCN2 e seu receptor 24p3R, além de um aumento significativo da proteína LCN2 e dos níveis de mRNA de BIM. A exposição a uma dieta rica em gordura ao longo da vida aumentou significativamente o peso dos animais e levou à diminuição dos níveis de mRNA da BIM além de reduzir os níveis de BCL2. Além disso, a combinação de sobrecarga de ferro e HFD exacerbou significativamente o aumento dos níveis de LCN2.

## **CONCLUSÕES**

Em conclusão, os resultados deste estudo dão suporte à hipótese de que a sobrecarga de ferro no início da vida e uma dieta rica em gordura são fatores de risco potenciais (cada um sozinho e em conjunto) para morte neuronal mediada por LCN2. Isso é especialmente importante se considerarmos que a suplementação preventiva de ferro com fórmulas fortificadas com ferro é comum na infância, apresentando efeitos adversos em diferentes domínios cognitivos, e que dietas ricas em gordura e hipercalóricas são comuns e associadas ao diabetes, especialmente o tipo 2, que também tem importantes impactos funcionais na saúde mental. Estudos futuros devem avaliar com mais detalhes a interação da sobrecarga neonatal de ferro e uma dieta hiperlipídica nas vias de morte neuronal e inflamação potencialmente associadas ao LCN2, bem como os resultados funcionais resultantes da associação desses dois tratamentos.

## **REFERÊNCIAS**

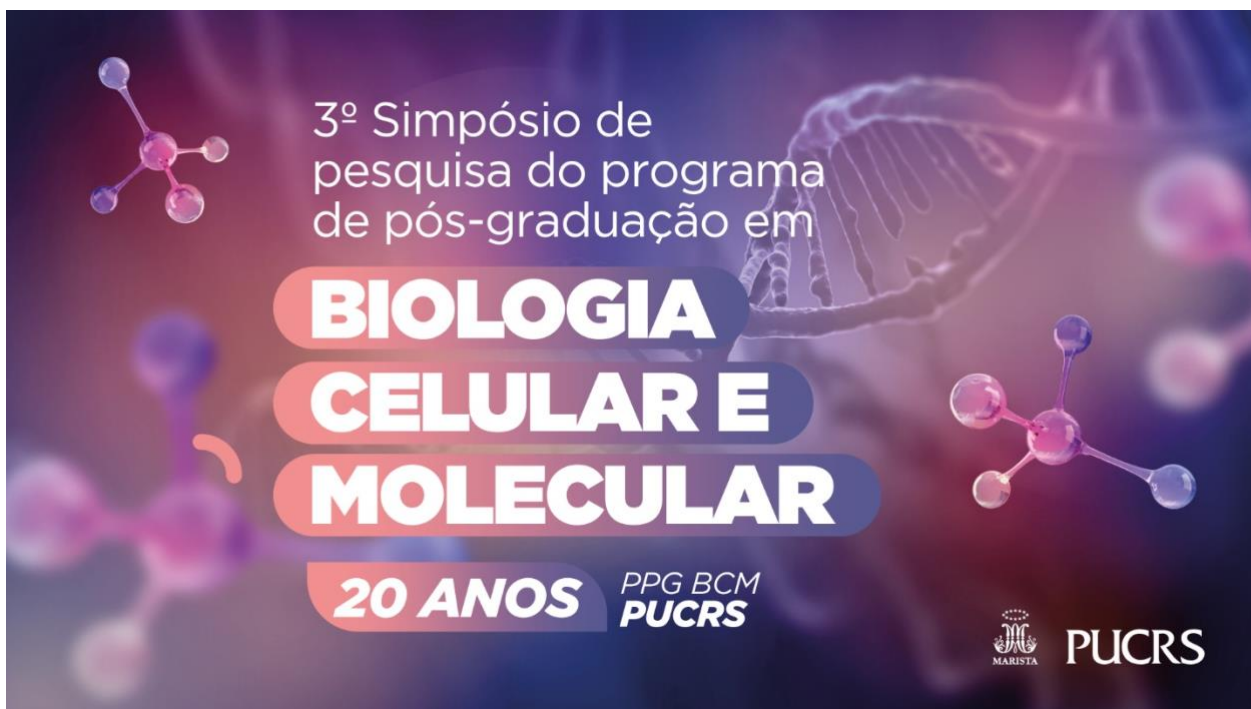
- BHUSAL, Anup et al. Paradoxical role of lipocalin-2 in metabolic disorders and neurological complications. *Biochemical Pharmacology*, [s. l.], v. 169, n. July, p. 113626, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113626>.
- JHA, Mithilesh Kumar et al. Diverse functional roles of lipocalin-2 in the central nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, [s. l.], v. 49, p. 135–156, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.12.006>.
- JIN, Zhen et al. Hippocampal lipocalin 2 is associated with neuroinflammation and iron-related oxidative stress in ob/ob mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, [s. l.], v. 79, n. 5, p. 530–541, 2020.
- SCHRÖDER, N.; FIGUEIREDO, L. S.; DE LIMA, M. N. Role of brain iron accumulation in cognitive dysfunction: evidence from animal models and human studies. *J Alzheimers Dis*, 34, n. 4, p. 797-812, 2013.

## **PALAVRAS-CHAVE:**

Ferro, Lipocalina-2; Doenças neurodegenerativas; Dieta hipercalórica; hipocampo

## **APOIO FINANCEIRO**


CNPQ, INCT-TM e CAPES



3º Simpósio de  
pesquisa do programa  
de pós-graduação em

**BIOLOGIA  
CELULAR E  
MOLECULAR**

**20 ANOS** PPG BCM  
PUCRS

 PUCRS

Porto Alegre, RS, Brasil.  
17 a 18 de abril de 2023

## Parceiros

