

GM

GENÉTICA DE MICRORGANISMOS



Efeito na expressão gênica da assimilação de aminoácidos em *Dekkera bruxellensis*

Cajueiro, DBB^{1,2}; Parente, DC²; Spinelli, KCM²; Pita, WB², Morais Jr, MA^{2,3}

¹Estudante de Mestrado do Programa de Genética da UFPE; ²Núcleo de engenharia metabólica - UFPE; ³Professor adjunto do programa de pós graduação em genética da UFPE.

batista.danielli@gmail.com

Palavras-chave: Regulação catabólica, nitrogênio, permease

O nitrogênio é um nutriente essencial para todas as formas de vida. Para isto as células são capazes de transportar e catabolizar uma grande variedade de compostos nitrogenados, bem como para sintetizar todas as moléculas que são essenciais para o desenvolvimento celular. As leveduras, tais como *Dekkera bruxellensis*, podem usar quase 30 compostos contendo nitrogênio. Estas moléculas entram nas células através de permeases e são utilizadas diretamente em reações de biossíntese ou servem como doadores de grupos amino para síntese de outros compostos dentro das células. Tudo isso é controlado por um mecanismo chamado de repressão catabólica do nitrogênio (NCR), o qual regula a expressão da maioria dos genes envolvidos no transporte e metabolismos das fontes secundárias de nitrogênio. Esta regulação é determinada pela “qualidade” ou preferência de utilização dos nutrientes a serem metabolizados. No presente trabalho iniciamos os estudos da NCR na levedura *D. bruxellensis* analisando a expressão de genes que codificam três permeases: MEP1, GAP1 e PUT4. Inicialmente, foi realizada uma classificação de preferência, cultivando a levedura em meio mineral contendo cada um dos 20 aminoácidos e glicose como fonte de carbono. Os aminoácidos foram classificados em 2 grupos: preferenciais (Arginina e Glutamina, Ácido aspártico, Glutâmico, Valina, Glicina e Treonina) e não-preferenciais (Leucina, Serina, Histidina, Asparagina, Lisina, Cisteína, Tirosina, Prolina, Fenilalanina, Triptofano, Isoleucina, Metionina e Alanina). A partir daí foram escolhidos representantes desses grupos, mais a amônia como referência, para os estudos de expressão gênica das permeases. Células cultivadas em meio contendo Alanina, Prolina, Isoleucina e Fenilalanina apresentaram alta expressão do gene GAP1, com destaque para o crescimento em Fenilalanina com 884 vezes mais transcritos do que em amônia. Já em Glicina obteve-se uma inibição do mesmo gene, isto corrobora com a hipótese de que este gene está relacionado com a percepção de aminoácidos não preferenciais. O gene MEP1 não apresentou indução em nenhum dos aminoácidos testados. Já para o gene PUT4 foi observada indução em meio contendo Histidina, Alanina, Prolina, Isoleucina e Fenilalanina, dando a entender que este gene pode estar relacionado não só com o metabolismo da prolina, mas com o de outras fontes de nitrogênio consideradas deficientes.

Suporte Financeiro: CNPq

Aspectos genômicos associados à resistência ao 5-hidroximetilfurfural (HMF) em *Saccharomyces cerevisiae*

Liberal, ATS¹; Morais Júnior, MA^{1,2}; Louis, EJ³

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, PE; ²Núcleo de Engenharia Metabólica (NEM), UFPE, Recife, PE; ³Centre for Genetic Architecture of Complex Traits (GACT), Leicester, UK

theresaliberal@yahoo.com.br

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, QTL, HMF.

Na fermentação alcoólica a levedura *Saccharomyces cerevisiae* converte os açúcares dos diferentes substratos em glicose, e este em dióxido de carbono e etanol. No Brasil utiliza-se caldo de cana cru ou o melaço, cujo açúcar é a sacarose, para essa fermentação. Além desses a produção biotecnológica de etanol tem focado no cultivo de leveduras geneticamente modificadas sobre os hidrolisados de biomassas lignocelulósicas. O processo se inicia com o pré-tratamento da biomassa para permitir a ação das enzimas hidrolíticas. Além disso, ocorre a formação de furfural a partir da oxidação de parte da xilose, de 5-hidroximetil furfural (HMF) da pequena fração de glicose. Seleção de linhagens resistentes a HMF a partir de linhagens industriais isoladas de processos de fermentação alcoólica foram realizadas na UFPE. A linhagem industrial P6 originou o mutante P6H9 que apresentou os melhores resultados tanto na formação de biomassa, em quantidades desejáveis mesmo na presença de 5-hidroximetilfurfural – HMF, quanto na assimilação de HMF. As linhagens P6 e P6H9 foram mantidas em meio acetato de potássio 2% para indução da formação de esporos (segregantes) que após serem visualizados em microscópio são submetidos a dissecação. Foram obtidos 96 segregantes da linhagem P6 e 20 segregantes da Linhagem P6H9. Os diferentes segregantes foram cultivados em meio YPD + 40mM de HMF (5Hidroximetilfurfural) para seleção de segregantes com maior resistência em 48 horas e 72 horas de cultivo. Linhagens laboratoriais (MA, NA, WA, WE, SA, m103, m104) também foram submetidas ao crescimento em meio YPD + 40mM de HMF para seleção de linhagens com menor resistência. Os segregantes industriais mais resistentes foram cruzados com as linhagens haploides laboratoriais mais sensíveis e esses diploides foram submetidos a esporulação e dissecação para obtenção de segregantes resistentes e sensíveis ao meio contendo HMF. A análise genética/genômica dessas linhagens e análise de loci de caráter quantitativo (QTL) foram inicialmente analisadas pela geração de linhagens haplóides com segregação do fenótipo de resistência associado ao genoma de linhagens haplóides de laboratórios com baixa resistência a HMF. Os segregantes P6-10C e P6-14C foram os segregantes mais resistentes ao cultivo em meio YPD+HMF em 48h e 72h respectivamente. Os segregantes P6H9-5A e P6H9-5C foram os segregantes mais resistentes ao cultivo em meio YPD+HMF em 48h e 72h respectivamente. E as linhagens m103 e m104 foram as linhagens laboratoriais mais sensíveis ao crescimento em meio YPD+HMF. Posteriormente, foram identificados os segregantes mais resistentes/ sensíveis ao HMF, dos diploides gerados (Linhagem industrial – P6/P6H9 X Linhagem laboratorial – m103/m104). Como perspectiva depois da caracterização genética, linhagens haploides resultantes das hibridizações e que apresentaram diferentes níveis de resistência serão utilizadas na análise genético-quantitativa da tolerância de *Saccharomyces cerevisiae* a agentes causadores de estresse celular presentes na fermentação alcoólica industrial.

Suporte Financeiro: CNPq

Avaliação de Polimorfismos nos Oncogenes E6 e E7 do Papilomavírus Humano Tipo 33 Associados à Carcinogênese Cervical no Nordeste Brasileiro

Oliveira Silva, RC¹; Gurgel, APAD¹; Nascimento, KCG¹; Crovella, S²; Freitas, AC¹; Chagas, BS¹

¹Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, UFPE, Recife, PE, Brasil; ²Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Variabilidade e Genética Humana, UFPE, Recife, PE, Brasil

ruanycristyne@hotmail.com; babisimas@gmail.com

Palavras-chave: Papilomavírus humano, Oncogene, Câncer cervical.

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus de DNA que tem a capacidade de infectar o tecido epitelial, sendo o contato sexual sua principal forma de transmissão. Atualmente mais de 200 tipos já foram descritos, além de subtipos e variantes. Estudos epidemiológicos tem mostrado que a infecção genital por HPV de alto risco tem função relevante no desenvolvimento do câncer cervical, o qual é considerado como a segunda neoplasia maligna mais comum entre mulheres no mundo. Com relação à prevalência do tipo viral, estudos confirmaram que o HPV-16 é o mais prevalente. Em Pernambuco o segundo tipo mais detectado é o HPV-31, seguido dos HPV-33, HPV-58 e HPV-18. E6 e E7 são os principais oncogenes de HPV e contribuem para a transformação celular. Alterações nucleotídicas entre os HPVs podem ocasionar mudanças nos aminoácidos codificados e gerar potenciais oncogênicos distintos. Neste estudo, nós identificamos a presença de mutações sinônimas e não sinônimas em E6 e E7 do HPV 33 presentes em mulheres com esfregaço cervical anormal. 100 amostras de raspagem cérvico-vaginal foram usadas para detectar e tipificar o HPV por Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando *primers* degenerados (MY09/11) e específicos (HPV-33). E6 e E7 foram amplificados com *primers* específicos e Taq DNA polimerase de alta fidelidade e em seguida sequenciados. As sequências obtidas foram alinhadas com a sequência de referência do HPV-33 (*GenBank*-NCBI) para identificar variantes genéticas. A importância das mutações para a função imunológica das proteínas E6 e E7 foi avaliada por predição de epítomos de células T e B. Oito amostras foram positivas para o HPV-33. Foram observados isolados com variações não sinônimas E6, as quais ocasionaram alterações de aminoácidos com propriedades físico-químicas diferentes, o que pode gerar uma possível alteração funcional, e também foram encontradas mutações sinônimas em E6 e E7. Com relação à predição de epítomos, em E6 foram identificadas cinco alterações de aminoácidos em sítios pertencentes à epítomos de células T, envolvendo tanto a atividade MHC I quanto em algumas alterações o MHC II. Alterações em células B não foi observado. Em E7 foram identificadas apenas mutações sinônimas. O presente estudo observou alterações não sinônimas em E6 do HPV-33 já descritas na literatura, sugerindo a possibilidade disto induzir alterações estruturais nas proteínas com consequentes alterações funcionais, as quais possivelmente podem causar um impacto na tumorigênese por intermédio do aumento do potencial oncogênico do HPV.

Suporte financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Variabilidade Intratípica dos Oncogenes E6 e E7 do Papilomavírus Humano Tipo 58 Associados à Carcinogênese Cervical no Nordeste Brasileiro

Oliveira Silva, RC¹; Gurgel, APAD¹; Nascimento, KCG¹; Crovella, S²; Freitas, AC¹; Chagas, BS¹

¹Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, UFPE, Recife, PE, Brasil; ²Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Variabilidade e Genética Humana, UFPE, Recife, PE, Brasil

ruanycristyne@hotmail.com; babisimas@gmail.com

Palavras-chave: Papilomavírus humano, Oncogene, Câncer cervical.

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus de DNA que infecta o tecido epitelial e mais de 200 tipos já foram descritos. Estudos epidemiológicos relacionam a infecção por HPV de alto risco e câncer cervical, o qual é considerado como a segunda neoplasia maligna entre mulheres no mundo. No Brasil, o HPV-16 é o tipo mais prevalente em todas as regiões. Estudos realizados em Pernambuco mostraram que o segundo tipo mais detectado é o HPV-31, seguido dos HPV-33, HPV-58 e HPV-18. E6 e E7 são os principais oncogenes de HPV e contribuem para a transformação celular. Alterações nucleotídicas entre os HPVs podem ocasionar mudanças nos aminoácidos codificados e gerar potenciais oncogênicos distintos. Neste estudo, nós identificamos a presença de mutações sinônimas e não sinônimas em E6 e E7 do HPV-58 presentes em mulheres com esfregaço cervical anormal. 100 amostras de raspagem cérvico-vaginal foram usadas para detectar e tipificar o HPV por Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando *primers* degenerados (MY09/11) e específicos (HPV-58). E6 e E7 foram amplificados com *primers* específicos e Taq DNA polimerase de alta fidelidade e em seguida sequenciados. As sequências obtidas foram alinhadas com a sequência de referência do HPV-58 (*GenBank-NCBI*) para identificar variantes genéticas. A importância das mutações para a função imunológica das proteínas E6 e E7 foi avaliada por predição de epítomos de células T e B. Trinta e três amostras foram positivas para o HPV-58. Foram observados isolados com variações não sinônimas em E7 e E6, as quais ocasionaram alterações de aminoácidos com propriedades físico-químicas diferentes, o que pode gerar uma possível alteração funcional, e também foram encontradas mutações sinônimas em ambos oncogenes. Com relação à predição de epítomos, em E7 foram identificadas nove alterações de aminoácidos em sítios pertencentes à epítomos de células T, envolvendo tanto a atividade MHC I quanto em algumas alterações o MHC II, e células B. Em E6 foram identificadas cinco alterações de aminoácidos em sítios pertencentes à epítomos de células T com atividade de ligação a MHC I, e célula B. O presente estudo observou alterações não sinônimas em E6 e E7 do HPV-58 já descritas na literatura, sugerindo a possibilidade disto induzir alterações estruturais nas proteínas com consequentes alterações funcionais, as quais possivelmente podem causar um impacto na tumorigênese por intermédio do aumento do potencial oncogênico do HPV.

Suporte financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

Identificação molecular de *Aeromonas hydrophila*

Magalhães, TC¹; Costa, MM²; Gouveia, GV³

¹Aluna do curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF, Petrolina, PE; ²Professor Adjunto do Colegiado Acadêmico de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF, Petrolina, PE; ³Professor Adjunto do Colegiado Acadêmico de Enfermagem, Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF, Petrolina, PE

tay_cm@hotmail.com

Palavras-chave: Identificação bacteriana, *Aeromonas hydrophila*, cpn60, rRNA 16S, gyrB

A identificação e caracterização de agentes patogênicos são de suma importância para o desenvolvimento de métodos de controle e de profilaxia. Técnicas moleculares são bastante precisas para identificar micro-organismos com base na sua sequência de DNA. *Aeromonas* é um gênero que compreende bactérias patogênicas que causam infecções principalmente em organismos aquáticos, o que acarreta perdas na produção. Os objetivos do presente estudo foi analisar, *in silico*, três genes (cpn60, rRNA 16S e gyrB) indicados para identificação de espécies de *Aeromonas* e apontar o melhor a ser utilizado na identificação de tais espécies. Sequências referentes aos 3 genes (cpn60, rRNA 16S ou o gyrB) foram retiradas do banco de dados genômico National Center for Biotechnology Information (NCBI) para análise da diversidade nucleotídica entre espécies de *Aeromonas*. Essas sequências foram alinhadas com programa ClustalW e, em seguida foram realizadas análises relacionadas a polimorfismos de nucleotídeos com o programa DnaSP. Para o gene cpn60 foram resgatadas, do NCBI, 17 sequências para *Aeromonas caviae*, 53 para *Aeromonas hydrophila*, 37 para *Aeromonas salmonicida*, 2 para *Aeromonas sobria* e 36 para *Aeromonas veronii*. Para o gene gyrB foram resgatadas 8 sequências para *Aeromonas caviae*, 440 para *Aeromonas hydrophila*, 118 para *Aeromonas salmonicida*, 70 para *Aeromonas sobria* e 393 para *Aeromonas veronii*. Para o gene rRNA 16S foram resgatadas 98 sequências para *Aeromonas caviae*, 538 para *Aeromonas hydrophila*, 95 para *Aeromonas salmonicida*, 161 para *Aeromonas sobria* e 485 para *Aeromonas veronii*. As análises de diversidade de nucleotídeos revelaram maior variabilidade entre espécies para o gene cpn60, indicando que ele pode ser utilizado na distinção de espécies de *Aeromonas*. Esse gene poderá ser utilizado em sequenciamentos de isolados de *Aeromonas* para identificação de espécies.

Apoio Financeiro: Capes, Facepe, CNPq

Pesquisa do gene da toxina diftérica em *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolados de caprinos e ovinos

Oliveira, SAS¹; Rosa, DS¹; Costa, MM²; Gouveia, GV³

¹Discente do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, PE; ²Docente do Colegiado de Zootecnia da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, PE; ³Docente do Colegiado de Enfermagem da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, PE

danillosrosa@gmail.com

Palavras-chave: Linfadenite caseosa, Patógeno de ovinos, virulência bacteriana, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, gene Tox

A ovino-caprinocultura é uma importante atividade econômica para o Nordeste brasileiro. No entanto, alguns entraves acabam limitando a produção como aqueles relacionados com problemas no manejo sanitário e doenças causadas por micro-organismos. A linfadenite caseosa é uma enfermidade causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis* e que traz prejuízos à produção. A identificação desse agente pode ser realizada através de isolamento, testes bioquímicos e moleculares. Sua virulência está ligada aos lipídeos da parede celular e à produção de uma exotoxina, a fosfolipase D (*pld*). Outras espécies de *Corynebacterium*, como o *C. diphtheriae* produzem, sintetizam e secretam outras toxinas como a toxina da difteria e sideróforos que induzem uma alta afinidade no sistema de captação de ferro e, isto está associado à virulência das bactérias. Quando sequenciado o genoma da cepa CP 31 (*tox*⁺) de *C. pseudotuberculosis* biovar *equi* (acesso no Genbank: CP 003421) o gene da toxina da difteria foi encontrado pela primeira vez nesta bactéria, indicando a importância de pesquisar a presença da mesma em isolados pertencentes ao biovar *ovis* (obtidos de pequenos ruminantes). O objetivo desse estudo foi detectar a presença do gene que codifica a toxina da difteria em isolados de *C. pseudotuberculosis* isolados de caprinos e ovinos. Em um trabalho anterior foram coletadas 463 amostras de linfadenite caseosa em propriedades rurais de Petrolina/PE e região, bem como amostras de abscessos do Abatedouro Municipal de Petrolina. No presente estudo, a extração do DNA foi realizada por choque térmico. Foram constituídos cinco pools de DNA, sendo que quatro continham 100 amostras de DNA em cada pool e um continha 63 amostras misturadas. A presença do gene da toxina diftérica foi verificada, nos pools, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de eletroforese em gel de agarose 1,5%. Para isso, foram utilizados dois controles positivos, sendo um a ATCC (American Type Culture Collection) número 27012 de *C. diphtheriae* e o outro o isolado CP 31 (*tox*⁺). Verificou-se que os pools dos isolados de caprinos e ovinos testados foram negativos para a presença do gene da toxina diftérica. . No entanto, é necessário que um teste individual de cada amostra seja realizado para a confirmação da negatividade e, que mais amostras do Brasil sejam testadas para afirmar a ausência desse gene em isolados de *C. pseudotuberculosis* biovar *ovis* no Brasil.

Análise de fatores de virulência em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* com diferentes contextos genéticos

Luz, ACO^{1,2}; Souza, ECA²; Leal-Balbino, TC²

¹Programa de Pós-graduação em Genética – Universidade Federal de Pernambuco, UFPE; ²Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

acarol.luz@gmail.com

Palavras-chave: Clone epidêmico brasileiro, Clone pediátrico, PVL, MSCRAMM, Biofilme, Toxina

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram positiva e oportunista, considerada a mais importante de seu gênero, responsável por uma ampla gama de infecções, as quais variam desde infecção de pele e tecidos moles, até bacteremia e pneumonia necrosante. Diversos fatores de virulência conferem ao *S. aureus* a capacidade de iniciar e manter uma infecção com sucesso. Entre estes fatores, destacam-se os MSCRAMMs (proteínas de superfície que reconhecem moléculas da matriz adesiva), como, por exemplo, a proteína de ligação à fibronectina, ao colágeno, e ao fibrinogênio; proteínas do loco *ica* (responsáveis pela formação de biofilme); a leucocidina Pantón-Valentine (PVL, participante na destruição do sistema imune do hospedeiro); e exotoxinas (cuja função superantigênica causa toxicidade sistêmica). Clones epidêmicos de *S. aureus*, com diferentes contextos genéticos, são observados distribuídos pelo mundo e, no Brasil, são observados o Clone Epidêmico Brasileiro (BEC) e o Clone Pediátrico (PC ou USA800), entre outros encontrados em menor frequência. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de melhor compreender a diversidade genética dos isolados clínicos de *S. aureus* na região nordeste e sua relação com as infecções humanas. Para tal, foram realizadas PCRs, utilizando *primers* descritos por diversos autores, para investigação dos genes dos fatores de virulência *fnbB* (ligação à fibronectina), *cna* (ligação ao colágeno), *clfA* e *clfB* (fatores *clumping*, ligação ao fibrinogênio), *icaA* e *icaD* (compõem o loco *ica*), *lukF-PV* e *lukS-PV* (formam a PVL), e genes que compõem o *cluster* gênico de enterotoxinas (*seg*, *sei*, *sem*, *sen* e *seo*). Foram estudados 89 isolados clínicos de *S. aureus* provenientes de três diferentes hospitais de Recife/PE, oriundos de diversas fontes de infecção e distintos setores hospitalares, relacionados a diferentes clones epidêmicos, sensíveis ou resistentes ao antibiótico meticilina. Como resultados, foram observadas as seguintes frequências: 66,6% para *fnbB* (58 positivos de 87 isolados estudados até o momento), 46% para *cna* (41/89), 100% para *clfA* (87 positivos de 87 isolados estudados até o momento), 96,5% para *clfB* (84/87), 100% para *icaA* e *icaD* (79/79), 64% para PVL (57/89), 99% para *seg* (88/89), 83% para *sei* (74/89), 91% para *sem* (81/89), 88% para *sen* (78/89) e, finalmente, 90% para *seo* (80/89). Diante dos dados encontrados, pode-se sugerir que os isolados clínicos de *S. aureus* estudados e circulantes em nossa região sejam capazes de colonização e infecção, possuindo o arcabouço genético para causar doenças graves e dificuldades no tratamento.

Apoio Financeiro: Facepe, CNPq.

Identificação do Tn 916 disseminando o gene de resistência tet-M em linhagens industriais de *Lactobacillus vini*

Mendonça, AA^{1,2}; Morais, MM¹; Morais, MA².

¹Laboratório de Resistência Bacteriana LRM-ICB/UPE. ²Laboratório de Genética de Microrganismos LGM-CCB/UFPE
allysonbiol@gmail.com

Keywords: Tn 916, tet-M, *Lactobacillus vini*, resistência bacteriana

Na indústria sucroalcooleira os antibióticos têm sido utilizados como ferramenta de controle e tratamento da contaminação bacteriana durante a fermentação alcoólica. Penicilinas e tetraciclina são drogas comumente usadas por seu amplo espectro de ação e baixos níveis de toxicidade a levedura fermentadora. Dentre as espécies bacterianas, *Lactobacillus vini* tem se destacado como um dos mais frequentes contaminantes da fermentação nas usinas da região nordeste do Brasil e na Suécia. Essa bactéria tem sido encontrada mesmo em unidades industriais que utilizam oxitetraciclina. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar os determinantes moleculares de resistência de *L. vini* a doxiciclina, droga representativa das tetraciclina, de duas linhagens industriais isoladas durante a safra de 2012/2013 de uma unidade industrial do nordeste brasileiro. As linhagens foram isoladas de amostras de mosto fermentado e identificadas por meio do sequenciamento parcial do gene pheS. As bactérias foram cultivadas em meio MRS Agar ou caldo em jarra com geradores de anaerobiose Anaerocult A por 24-48h a 37°C na presença de discos contendo as drogas estreptomicina, cloranfenicol, eritromicina, doxiciclina ou penicilina e os diâmetros dos halos foi avaliado segundo o CLSI 2009. A linhagem D2 apresentou resistência apenas a doxiciclina (halo de 12mm) enquanto que a linhagem D7 apresentou resistência intermediária também para doxiciclina (halo de 15mm). A confirmação da resistência foi feita por determinação da MIC para doxiciclina pela metodologia de microdiluição em caldo tendo como controle a ATCC 29212. Nesse caso, a linhagem D2 confirmou o fenótipo com valor da MIC em 32 µg/mL. A partir daí foram desenhados iniciadores com base em sequências dos genes tet (*tet-K*, *tet-L* e *tet-M*) de outras bactérias Gram-positivas. Destes apenas o gene tet-M foi positivo. A identidade do gene foi confirmada por sequenciamento. Em seguida foram utilizados iniciadores para identificação do transposon Tn916 baseados na região codificadora da integrase-excisase (*int-cis*) e sua tipagem foi realizada amplificando-se a região intergênica do *tet-M* a *int-cis*. A amplificação positiva, seguida de confirmação por sequenciamento, mostrou que o gene *tet-M* em *L. vini* se localiza dentro do Tn916, o qual foi tipificado como a forma comum do transposon pela amplificação da uma região intergênica de 2,5 a 3kb. Este se mostrou um elemento genético móvel já que a marca de resistência foi transferida por conjugação de *L. vini* para células de *Enterococcus faecalis* elevando a MIC deste para 32 µg/mL. Este é o primeiro relato de linhagens industriais portando esses genes de resistência juntamente com o tn916 que indicam que o uso das tetraciclina como controle da contaminação está sendo ineficaz. Adicionalmente, estas linhagens podem atuar como reservatórios naturais desses determinantes de resistência, eventualmente, promover sua disseminação no ambiente e sua transferências para espécies mais patogênicas.

Clonagem dos genes e expressão da proteína E do vírus da Dengue tipos 2 e 4.

Araújo, HCS¹; Guimarães, BD²; Weller, M³.

^{1,2}Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS). Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Campina Grande, Brasil;

³Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública. Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Campina Grande, Brasil.

csa.herbert@gmail.com

Palavras-chave: Clonagem, Dengue, proteína E, expressão, plasmídeos.

A geração de anticorpos monoclonais requer como base o uso de proteínas específicas. O presente trabalho, iniciado em maio de 2014, envolve a clonagem e expressão da proteína E do vírus da Dengue tipos 2 e 4. O DNA abrangendo o gene da proteína E do vírus da Dengue 2 e 4, utilizado no trabalho, foi obtido através da FIOCRUZ em Recife. A amplificação do gene da proteína E envolve PCR, a qual permite gerar em maiores quantidades especificamente o trecho de DNA de interesse, contendo cerca de 1500 pares de bases, tamanho correspondente ao material já amplificado, de acordo com o que foi mostrado pela eletroforese em gel de agarose. A expressão da proteína E envolve ainda a combinação de outras técnicas da Biologia Molecular, aplicadas cada uma à sua etapa correspondente. O vetor de clonagem utilizado, pGEX-2T, consiste em uma molécula de DNA circular que inclui a sequência CCCGGG, reconhecida para corte pela enzima de restrição Sma I e o gene para Glutathione S-transferase, possibilitando a subsequente ligação do gene da proteína E ao vetor de clonagem pela enzima T4 DNA ligase, formando nova molécula circular, que servirá para a expressão da proteína quimérica GST-Proteína E, viabilizando a purificação da proteína E. A fusão da proteína E da Dengue com a Glutathione S-transferase (GST) justifica-se, haja vista que GST possui alta afinidade à glutathione, contida na coluna onde será feita eluição da proteína desejada. Nas etapas seguintes, os plasmídeos deverão ser inseridos em células de *Escherichia coli* para expressão da proteína E. Para isso, será realizado cultivo de *E. coli* visando geração de células competentes, as quais receberão choque térmico para transformação com inserção do plasmídeo. Para o controle dos diferentes plasmídeos, serão criadas em placas de Petri, a partir de células singulares, colônias de células idênticas a fim de que, por meio de PCR, seja feita nova amplificação para verificar quais clones contêm o gene da proteína E da Dengue, reconhecido por eletroforese, pré-selecionando os fragmentos para sequenciamento, cuja finalidade é verificar se as bases realmente codificam os aminoácidos corretos e se a ordem dos aminoácidos é correta, visto que a adição ou falta de uma única base pode gerar uma proteína falsa e/ou incompleta. Depois de expressa e purificada a proteína com base nos métodos supramencionados, esta será transferida para uma membrana (Western-blot) para visualização pela aplicação de anticorpos após separação por eletroforese em gel. A verificação da proteína correta representa a etapa final do projeto. A proteína pode, com isso, ser expressa e encaminhada à geração de anticorpos monoclonais.

Detecção do gene *floR* em isolados de *Aeromonas* spp.

Silva, NCSL¹; Costa, MM²; Veneroni-Gouveia, G³

¹Mestranda em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, PE; ²Professor Adjunto do Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, PE; ³Professor Adjunto do Colegiado de Enfermagem, Universidade Federal do Vale do São Francisco, PE.

naedjacarla@hotmail.com

Palavras-chave: patógeno, peixes, florfenicol, aeromonas, gene *floR*

O florfenicol é um antimicrobiano utilizado em ampla escala na piscicultura, principalmente em sistemas de criações intensivas onde há um aumento do estresse e rápida disseminação de doenças bacterianas nos peixes. O florfenicol é o único antimicrobiano liberado para tratamento de infecções bacterianas no Brasil e seu uso indiscriminado acarreta a resistência de bactérias. Um dos genes que vem sendo correlacionado com a resistência bacteriana ao florfenicol é o gene *floR*. O objetivo desse estudo foi verificar a presença do gene *floR* em isolados de *Aeromonas* spp.. Nesse estudo foram utilizados 44 isolados de *Aeromonas* spp. obtidos a partir do rim, tegumento, intestino e lesões de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) com e sem sintomatologia clínica e de pool de branchonetas (*Dendrocephalus brasiliensis*) destinadas à alimentação de peixes carnívoros. Os animais foram provenientes da Barragem de Sobradinho/BA e do Projeto Bebedouro da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF/PE). Esses isolados foram caracterizados por meio de suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas e estão armazenados na bacterioteca do laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Foi realizada a extração de DNA dos isolados pelo método de termo-extração. Em seguida as amostras de DNA foram submetidas a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com a utilização de *Primers* específicos para o gene *floR*. A reação constou de Tampão de enzima (1x), Cloreto de Magnésio (2,5 mM), *Primer* (0,6 µM), dNTP (0,4 µM), Taq DNA Polimerase (2,5 U) e 5 µl de DNA, em um volume final de 25 µl. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Dentre os 44 isolados de *Aeromonas* spp. avaliados, 30 foram positivos para o gene *floR*. Esse gene já foi detectado em algumas espécies de bactérias, inclusive na espécie *Aeromonas bestiarum* e no gênero *Vibrio*, filogeneticamente próximo de *Aeromonas* spp.. Estudos demonstram que esse gene tem relação com a resistência ao antimicrobiano florfenicol e pode estar atuando por um mecanismo de bomba de efluxo. O uso indiscriminado do florfenicol na piscicultura pode ser um fator de seleção de bactérias resistentes e propagação desses genes nos sistemas de criação por meio de elementos genéticos móveis. A detecção da presença desse gene nas bactérias do Vale do São Francisco se torna de grande importância para que sejam tomadas medidas de controle ao uso excessivo e não adequado do florfenicol nos sistemas de criação de peixes.

Análise da diversidade genética de *Aedes aegypti* de Fernando de Noronha baseada em genes mitocondriais

Marroquim, BCB¹; Guedes, DRD¹; Melo-Santos, MAV¹; Acioli, RV²; Souza, MFM²; Araújo, YV²; Regis, L¹; Ayres, CFJ¹.

¹Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, Brasil; ²Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, Brasil

barbara.marroquim@gmail.com

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, NADH desidrogenase subunidade 4, Citocromo Oxidase subunidade 1.

A dengue é uma importante arbovirose que tem como vetor principal o mosquito *Aedes aegypti*. Apesar de todos os esforços para diminuir a densidade desse mosquito, seu controle ainda é um desafio. Dessa maneira, o conhecimento da biologia do vetor, com o uso de novas tecnologias como a análise do DNA mitocondrial, é importante na elaboração de medidas de controle eficientes. O presente estudo visa à análise da variabilidade genética de populações de *Ae. aegypti* do Arquipélago de Fernando de Noronha (FN/PE), nos anos de 2010 e 2011, através da análise de dois genes mitocondriais: NADH Desidrogenase Subunidade 4 (ND4) e Citocromo Oxidase 1 (COI). Nesse trabalho, foram analisadas no total 648 amostras provenientes de 13 bairros diferentes da ilha principal. A metodologia seguiu as etapas de extração de DNA de mosquitos individuais, amplificação de fragmentos de DNA via PCR dos genes ND4 e COI, sequenciamento e análise das sequências. A análise do sequenciamento revelou que não houve variação genética entre as populações estudadas a partir das amostras coletadas no ano de 2010 para os dois genes. Para as análises das amostras coletadas no ano de 2011, foram realizadas PCRs para o gene ND4 em 60 indivíduos, onde foram identificados 12 haplótipos, com distância genética variando de 0,003 a 0,021, dentre os quais o mais comum apresentou identidade de 100% com um haplótipo previamente descrito no Brasil. Para o gene COI, foram analisados 256 indivíduos do ano de 2011, e foram identificados cinco haplótipos diferentes, que quando comparados entre si, diferiram em transições e substituições A↔G, C↔T e A↔C, com distância genética que variou de 0,002 a 0,005. Quando comparados com haplótipos depositados no PUBMED, o haplótipo mais comum na ilha (H1) apresentou identidade de 100% com um haplótipo previamente descrito no Brasil e na Martinica. Os resultados revelam que essa grande variação observada entre os anos pode ter ocorrido devido aos diferentes períodos de coleta, já que a coleta do ano 2010 foi realizada anteriormente ao período chuvoso e no ano 2011 posterior às chuvas, ou pode ser explicado por uma introdução recente de mosquitos na ilha. A caracterização desses haplótipos é fundamental para o rastreamento de possíveis fontes de colonização da ilha, o que propiciará a implementação de medidas mais eficientes para o controle do vetor.

Suporte Financeiro: CNPq e FIOCRUZ

Diagnóstico molecular da infecção vetorial de *Culex quinquefasciatus* por *Wuchereria bancrofti* em áreas endêmicas de Filariose Linfática na Região Metropolitana do Recife/PE

Araújo, TA^{1,2}; Ayres, CFJ²; Albuquerque, AL²; Oliveira, CMF².

¹Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ/PE; ²Departamento de Entomologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães –CPqAM/FIOCRUZ/PE

tatiane.araujo@cpqam.fiocruz.br

Palavras-chave: Xenomonitoramento molecular, PGEFL, *Culex quinquefasciatus*

A filariose linfática é uma doença exclusiva dos seres humanos, causada pelo verme *Wuchereria bancrofti* e transmitida pelo mosquito fêmea *Culex quinquefasciatus*, principal vetor da parasitose. As áreas endêmicas são de clima tropical e subtropical e se caracterizam, principalmente, pela falta de saneamento básico. A Organização Mundial de Saúde propôs uma estratégia para eliminar a filariose até o ano de 2020 e o Brasil tornou signatário dessa proposta em 1997. Atualmente a distribuição da doença, no país, está restrita à Região Metropolitana do Recife (RMR) que preconizou para as comunidades sob o risco de transmissão o Tratamento Coletivo (TC) da população humana com o filaricida Dietilcarbamazina. Como parte da avaliação da eficácia das estratégias de controle adotadas, utilizou-se o xenomonitoramento molecular a fim de verificar a interrupção da transmissão da *W. bancrofti*. O xenomonitoramento é um método baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do verme em mosquitos. Essa técnica molecular é um marcador sensível e útil para estimar os níveis de infecção natural em mosquitos e uma ferramenta que permite inferir a atividade da transmissão do parasita para a população humana, porque revela a presença de microfírias recém-ingeridas pelos insetos. A fim de monitorar a eficiência do programa de controle nos municípios de Olinda, Recife e Jaboatão dos Guararapes foi estimada a taxa de infecção vetorial em *C. quinquefasciatus* pela *W. bancrofti*. Mais de 10.000 fêmeas foram coletadas e foi feita a padronização da PCR multiplex para o diagnóstico de infecção vetorial. O DNA foi extraído de pools de cinco mosquitos e um total de 2.050 pools foi analisado nessas áreas e não foram encontrados mosquitos infectados pelo verme filarial. Nossos dados mostram que a prevalência infecção vetorial foi nula, o que correspondeu a diferentes períodos de tratamento coletivo. Portanto, observa-se que à medida que diminui o número de pessoas microfilarêmicas em decorrência do TC, diminui também a chance do mosquito vetor do parasito se infectar e propagar a enfermidade. A taxa de infecção vetorial pela PCR é um indicador importante para avaliação da eficiência das estratégias da OMS até que ocorra a certificação da interrupção do ciclo de transmissão da filariose.

Apoio financeiro: FACEPE/PPSUS

Caracterização molecular do *Glomerella cingulata* e verificação da presença da rota biossintética de paclitaxel (taxol), através de marcadores moleculares

Andrade, HF¹; Moura, PA¹; Araújo, TA³; Mendes, TCD¹; Barbosa, AV¹; Vila-Nova, MX²; Araújo, LCA¹; Silva, MV¹.

¹Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Pernambuco, PE; ²Faculdade São Miguel, FSM, Pernambuco, PE; ³Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Pernambuco, PE.

tatiane.araujo@cpqam.fiocruz.br

Palavras-chave: Sequenciamento, Paclitaxel, Biossíntese, *Glomerella cingulata*.

Atualmente as plantas possuem mecanismos promissores, evolutivamente, e que propiciam uma excelente integração no que diz respeito planta-microrganismo. Alguns estudos demonstram que os microrganismos possuem importantes funções para os seus hospedeiros, pois podem sobreviver em simbiose e mutuamente. Em 1993 foi registrado pela primeira vez, um fungo produtor de taxol, um diterpenóide e tem efeito contra o câncer de mama e o útero. O objetivo desse trabalho foi caracterizar, molecularmente, o fungo endofítico *Glomerella cingulata* e realizar um rastreamento primário, por meio de genes chaves da via biossintética, a possível produção do paclitaxel. Para a execução foi utilizado o fungo *Glomerella cingulata*, depositado na micoteca - URM na UFPE em 2013, da folha da planta *Plantago major* L. A extração do DNA foi realizada por meio da técnica CTAB descrita por Murray e Thompson 1980, com algumas modificações. O DNA foi amplificado por PCR com primer universal ITS 1 e ITS 4. Logo após foi feita um rastreamento primário com três genes chaves na rota biossintética do paclitaxel por PCR. Os primer's utilizados foram: ts-F, ts-R, dbat-F, dbat-R, bap-F, bap-R. A caracterização molecular, sequenciamento, permitiu a comparação e confirmação do gênero e espécie, através do National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando o BLAST. A PCR com os genes específicos da biossíntese do paclitaxel permitiu a confirmação da presença desses genes, o que sugere a possível produção do paclitaxel pelo fungo *Glomerella cingulata*. Dessa forma, verifica-se que o fungo endofítico *Glomerella cingulata* possui a rota da biossíntese do paclitaxel e por isso pode ser um excelente produtor desse antitumoral. Faz-se necessário análises posteriores como: extrato em fase orgânica para qualificação da produção do paclitaxel, por meio do HPLC.

Apoio financeiro: Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES)

Detecção do vírus Dengue por RT-PCR Multiplex e Platelia™ Dengue antígeno NS1 em *Aedes aegypti* de Fernando de Noronha-PE

Barbosa, PP¹; Guedes, DRD¹; Ayres, CFJ¹; Melo-Santos, MAV¹; Acioli, RV²; Regis, L¹

¹Departamento de Entomologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ), Av. Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife PE, Brazil; ²Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco.

priscillapaschoal@hotmail.com

Palavras-chave: Mosquito, DENV, RNA, RT-PCR, NS1.

O mosquito *Aedes aegypti* mantém um íntimo contato com o hospedeiro humano como consequência do seu comportamento antropofílico e domiciliar. Essas características contribuem para que ele seja um eficiente transmissor de arboviroses como febre amarela e dengue. A dengue continua acometendo anualmente milhares de pessoas no Brasil, desde a década de 80. O arquipélago de Fernando de Noronha, localizado no estado de Pernambuco, possui infestação pelo *Aedes aegypti* semelhante a de outras cidades brasileiras. A ilha é considerada uma porta de entrada da dengue, por receber turistas brasileiros e do exterior, que podem chegar já infectados. Como não há ainda vacina anti-dengue disponível, as ações para controle da transmissão são destinadas principalmente ao controle do vetor, na tentativa de reduzir o contato vetor-hospedeiro. O objetivo desse trabalho foi monitorar os sorotipos de DENV nas amostras coletadas nas residências e/ou trabalho dos pacientes. Ações de bloqueio mecânico foram realizadas nas residências de pacientes com infecção confirmada ou suspeita clínica de dengue em FN em 2011-2012, utilizando aspiradores de mosquitos adultos e armadilhas para coleta de ovos. Os mosquitos foram coletados e armazenados em *pools*, o RNA de cada *pool* foi extraído usando Trizol® e, posteriormente, esses RNAs foram usados nas reações de RT-PCR através da técnica de PCR multiplex. Após a identificação de amostras positivas, foi calculada a taxa mínima de infecção (MIR) que representa o quociente de *pools* positivos pelo total de mosquitos analisados x 1000. Foram analisados 339 *pools* de mosquitos, dentre os quais 140 *pools* apresentavam RNA íntegro, verificado por RT-PCR para o gene RPL-8. Os resultados indicam a importância de melhorar o protocolo de acondicionamento/transporte para otimizar a preservação do RNA nas amostras. Entre os 140 *pools* foi detectado um *pool* positivo (DENV-1) pela técnica de RT-PCR *multiplex* e MIR calculado foi de 1,8. Houve concordância entre o vírus diagnosticado no paciente e o encontrado no *pool* de mosquitos coletados na casa deste paciente, ambos do sorotipo DENV-1, indicando que o paciente pode ter sido infectado na sua residência e a transmissão foi autóctone. Como o MIR foi mais baixo que o esperado, devido ao elevado número de pessoas diagnosticadas com Dengue em FN, as amostras de mosquitos submetidas à RT-PCR neste projeto, foram submetidas, também, ao teste Platelia Dengue NS1 Ag (Bio-Rad) e o MIR passou para 17,6. Apesar do teste Platelia não detectar o sorotipo das amostras, ele apresentou melhor desempenho em detectar o DENV do que a RT-PCR.

Apoio financeiro: CNPq e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ)

Diversidade de micro-organismos produtores de ácido láctico em biofertilizantes oriundos da biodigestão anaeróbia

Silva, JF da¹; Honorato, A da C²; Regitano, LC de A³; Malagó Júnior, W³; Gouveia, GV⁴; Gouveia, JJ de S⁴; Queiroz, MAÁ⁴; Costa, MM da⁴; Yano-Melo, AM⁴.

¹Pós-Graduação em Ciência Animal, Univasf, Petrolina, PE; ²Graduação em Engenharia Agrícola, Univasf, Petrolina, PE; ³Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP; ⁴Professor Adjunto, Univasf, Petrolina, PE

Palavras-chave: Dejetos; Caprinos; Ovinos; Fermentação; *Cenchrus ciliaris*.

O tratamento de dejetos de origem animal, a partir da biodigestão anaeróbica, visa a adequada fermentação com diminuição de micro-organismos indicadores de poluição fecal que iriam retornar ao solo. O objetivo desse estudo foi avaliar a diversidade de micro-organismos produtores de ácido láctico em biofertilizantes formulados com dejetos de caprinos e ovinos. Foram produzidos dois biofertilizantes a partir de biodigestão anaeróbica com dejetos de caprinos (BC) e ovinos (BO) que consumiram a mesma dieta, a base de capim elefante e concentrado (50:50). Amostras dos biofertilizantes e de solo rizosférico de *Cenchrus ciliaris* L. virgem (sem aplicação dos biofertilizantes) foram submetidas a extração de DNA total com kit específico (Soil DNA Isolation NorgenBiotek Corporation). As amostras de DNA foram utilizadas em PCRs (Reação em Cadeia da Polimerase) contendo primers universais para procariotos. Os produtos de PCR foram purificados utilizando-se beads magnéticos (Agencourt AMPure XP). O produto purificado foi submetido a uma segunda PCR para ligação de adaptadores Index, usando-se o kit Illumina Nextera XT Index e, novamente purificado com beads magnéticos. As amostras foram reunidas em um único *pool*, que foi submetido a eletroforese em gel de agarose seguida por purificação (Zymoclean Gel DNA Recovery KIT). O *pool* purificado do gel foi quantificado por PCR em tempo real. Em seguida, 10 pM de DNA foi sequenciado no equipamento MiSeq (Illumina®). As sequências foram analisadas utilizando-se o software Mothur. Foram obtidas 2.307 sequências de micro-organismos do Reino Bacteria, Filo Firmicutes, Classe Bacilli, sendo 59,55% pertencentes ao BO, 28,95% ao BC e 11,48% ao solo. Desse total, 99,47% pertenciam a Ordem Bacillales e apenas 0,53% a Ordem Lactobacillales. Dentro da Ordem Bacillales, a maioria das sequências (93,82%) se enquadravam na Família Planococcaceae, com 64,05% presentes no BO, 31,36% no BC e 4,59% no solo, com predominância de micro-organismos do gênero *Solibacillus*. Também foram encontradas sequências das Famílias Bacillaceae e Paenibacillaceae, mais predominantes no solo, encontrando-se os Gêneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Terribacillus*, *Ureibacillus* da Família Bacillaceae e *Brevibacillus*, *Cohnella*, *Oxalophagus*, *Paenibacillus* e *Thermobacillus* da Família Paenibacillaceae. Apenas o solo inicial apresentou sequências da Família Alicyclobacillaceae (Gênero *Alicyclobacillus* *Tumebacillus*), Staphylococcaceae (Gênero *Staphylococcus*) e Thermoactinomycetaceae (Gênero *Seinonella*). Dentro da ordem Lactobacillales, todas as sequências pertenciam a família Carnobacteriaceae, gênero *Desemzia*, com 81,8% presente no BO e 9,1% no BC e solo. O biofertilizante ovino apresentou maior diversidade de micro-organismos acidófilos, podendo-se sugerir que o mesmo proporciona maior produção de ácido láctico, com melhor adequação do processo fermentativo, importante para o tratamento mais apropriado dos dejetos, devido a diminuição do pH e consequente inibição de micro-organismos que poderiam contaminar o solo.

Detecção de genes relacionados com a captação de ferro em *Aeromonas spp.* oriundas do Vale do São Francisco

Freitas, MR¹; Costa, MM²; Veneroni-Gouveia, G³

¹Discente em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE; ²Professor Adjunto do Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE; ³Professor Adjunto do Colegiado de Enfermagem, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE.

marianaramosfreitas@hotmail.com

Palavras-chave: Patógeno de peixes, gene de captação de ferro, sideróforos

A piscicultura na região Nordeste do Brasil tem grande potencial, sendo uma importante atividade socioeconômica. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das espécies mais indicadas para a criação intensiva. E, a infecção por bactérias do gênero *Aeromonas* é uma das causas de grandes prejuízos à piscicultura. A patogênese bacteriana está associada a diversos fatores, e um dos fatores que pode contribuir para a sobrevivência e virulência de bactérias no interior dos hospedeiros é a aquisição de ferro. A baixa disponibilidade do ferro livre dificulta, mas não impede o crescimento e patogenicidade de bactérias. Isso ocorre, porque os micro-organismos desenvolveram diversas estratégias que lhes permitem extrair ferro a partir de polímeros insolúveis e de seus hospedeiros. A obtenção de ferro pode ser realizada por dois mecanismos, sendo um dependente de sideróforos e o outro independente de sideróforos. Estes são quelantes de ferro que removem o ferro de proteínas ligantes do hospedeiro e o conduzem para entrar na célula bacteriana por meio de receptores externos de membrana. No mecanismo de aquisição de ferro independente de sideróforos, proteínas auxiliam as bactérias no processo de obtenção de ferro. Ambos os mecanismos utilizados na obtenção de ferro são complexos e envolvem a expressão de vários genes. Com isso, o objetivo do presente estudo foi verificar a presença de genes relacionados à captação de ferro em isolados de *Aeromonas spp.* provenientes do Vale do São Francisco. Foram utilizados 41 isolados de *Aeromonas spp.* coletados de amostras de peixes obtidas de rim, tegumento, intestino e lesões de tilápias (*Oreochromis niloticus*) e pacamãs (*Lophiosilurus alexandri*) com e sem sintomatologia clínica e de pool de branchonetas (*Dendrocephalus brasiliensis*) destinadas à alimentação de peixes carnívoros. Os animais foram provenientes da Barragem de Sobradinho/BA e do Projeto Bebedouro da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF/PE). As amostras foram caracterizadas através da coloração de Gram e testes bioquímicos. Os DNAs das amostras foram extraídos por choque térmico e utilizados em reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para verificar a presença dos genes (Amonabactina (AmoA), proteína semelhante a pioverdina (pvcAB) e Fur) relacionados a captação de ferro. Os primers utilizados nas PCRs do gene Fur foram retirados da literatura e os outros foram delineados utilizando-se o programa Primer3 Plus. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizados sobre iluminação UV. Dentre os isolados avaliados, 5 se mostraram positivos para a presença do gene Fur, 07 para o gene AmoA e 02 para o gene pvcAB. A presença desses genes nos isolados indica maior potencial de virulência por meio da capacidade de aquisição de ferro.

Apoio financeiro: CAPES, FACEPE

Identificação e caracterização de bactérias ácido-lácticas de silagem de capim elefante com resíduo de uva

Abreu, REF¹; Silva, KTC¹; Formiga, MA¹; Gouveia, JJS²; Costa, MM².

¹Mestrandos em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco, PE; ²Professor Adjunto do Colegiado de Zootecnia, Universidade do Vale do São Francisco, PE

r-franco2011@hotmail.com

Palavras-chave: Forragens, *Lactobacillus*, sequenciamento, *Pennisetum purpureum*, *Enterococcus faecium*

Nas regiões semiáridas, onde ocorre sazonalidade na produção de forragens para alimentação animal, a utilização de técnicas como a de ensilagem surge como alternativa de conservação do alimento e manutenção de reservas para a caprinovinocultura em períodos críticos. Bactérias ácido lácticas presentes neste material utilizam-se de carboidratos facilmente solúveis, para seu metabolismo, gerando ácidos orgânicos que diminuem o pH da silagem diminuindo o crescimento de microrganismos indesejáveis. O objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar bactérias ácido-lácticas de silagem de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) acrescido de resíduo de uva a fim de se criar um banco de bactérias desta fonte. Foram coletadas 100g de 8 mini-silos com diferentes concentrações de resíduo de uva, nomeados de A-H, onde uma alíquota de 10g foi diluída de forma seriada em solução salina 0,85% para serem semeadas em meio de MRS *Lactobacillus* acrescido de Ágar e nistatina e foram incubadas em condições de anaerobiose a 37°C por 48 horas. Colônias com características de bacilos Gram-positivos foram isoladas e armazenadas até extração do DNA pela técnica de termoextração. O DNA, foi submetido a PCR com a utilização de um primer universal para procariotos, em seguida foi purificado e sequenciado. A qualidade dos eletroferogramas foi avaliada com o programa Phred. Foram obtidos 8 isolados de bacilos Gram-positivos, sendo um de cada uma das amostras A, B, C, D, E, F, G e H, os quais apresentaram na avaliação morfológica colônias com aspecto oval, esbranquiçadas, com superfície convexa e com odor ácido. Os sequenciamentos dos produtos amplificados revelaram similaridade do isolados obtidos de A, F e B com o gênero *Lactobacillus* spp. sendo os isolados obtidos de F e B classificados como pertencentes às espécies *L. paracasei* e *L. Plantarum*, respectivamente. Estas espécies tem sido relatadas como principais fermentadoras de silagem. Já o isolado obtido do silo D foi caracterizado como *Enterococcus faecium*. O resultado do sequenciamento das amostras A, F e B foram compatíveis com a análise tintorial e morfológica dos mesmos isolados, caracterizados como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* spp.. Porém o mesmo não ocorreu com a amostra D, pois o gênero *Enterococcus* spp. não apresenta característica morfológica de bacilo, mas é enquadrado no grupo das bactérias ácido lácticas. As demais amostras não apresentaram qualidade Phred suficiente para serem analisadas. Desta forma a caracterização de bactérias ácido-lácticas, foi possível através da avaliação das características morfológicas, tintoriais e pela técnica de sequenciamento do DNA.

Suporte-Financiamento: CNPq/CAPES e Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Utilização de genética reversa para o desenvolvimento de ferramentas para a triagem de extratos naturais com propriedades antivirais contra flavivírus

Carvalho, AGO^{1,3}; Bertani, GR²; Gil, LHV³

¹Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE;

²Departamento de Bioquímica Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE;

³Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife - PE.

amanda2307@gmail.com

Palavras-chave: Flavivírus; antivirais.

O vírus da febre amarela (YFV), protótipo do gênero flavivirus, causa uma doença de amplo espectro, que vai desde formas inaparentes a formas hemorrágicas agudas, podendo ser fatal. Não há um tratamento licenciado para flavivírus e centenas de novos casos em humanos são notificados ao ano no mundo. Os métodos tradicionais para triagem de antivirais são laboriosos, demorados e difíceis para usar em ensaios de larga escala. O objetivo deste trabalho foi triar, em larga escala, extratos naturais para tratamento de flavivírus utilizando ferramentas feitas por técnicas de genética reversa. Foram triados 5200 extratos naturais, em larga escala, utilizando a linhagem celular BHK-21-repYFV17D-LucNeoIres, no qual expressa constitutivamente um replicon bicistrônico do YFV, no qual contém o gene repórter luciferase firefly e o gene de seleção neomicina fosfotransferase no primeiro cístron e no segundo cístron as proteínas não estruturais do YFV, responsáveis pela sua replicação. A avaliação da atividade antiviral do extrato natural foi feita através da mensuração da atividade da luciferase, onde se calculou a porcentagem de inibição em relação ao controle negativo nas concentrações de 20 e 40 µg/mL durante 48 horas de incubação. Extratos que inibiram mais de 50% a atividade da luciferase foram considerados com possíveis atividades antivirais contra o YFV. Dos 5200 extratos triados, 94 deles mostraram mais de 50% de inibição da atividade da luciferase firefly. Para uma segunda etapa de confirmação, os extratos naturais foram incubados na concentração de 40 µg/mL por 48 horas em células BHK-21 selvagens infectadas com o vírus recombinante YFV-GLuc (MOI 0,1), no qual expressa o gene repórter gaussiana luciferase. A porcentagem de inibição da atividade da luciferase foi calculada novamente em relação ao controle negativo. Dos 94 extratos triados na linhagem celular, 71 foram testados com o vírus recombinante YFV-GLuc e 59 deles inibiram mais de 50% de sua replicação após 48 horas de incubação na concentração de 40 µg/mL. Os extratos naturais triados na linhagem celular e confirmados com o vírus recombinante serão submetidos a ensaios de placa com os vírus selvagens YFV17DD e dengue sorotipo 2. O uso inovador da genética reversa para a construção de ferramentas para a triagem em larga escala de extratos naturais com potencial antiviral poderá potencializar a descoberta de possíveis antivirais contra flavivírus.

Apoio Financeiro: FACEPE, CNPq

Utilização de genética reversa para o desenvolvimento de teste para diagnóstico diferencial de flavivírus

Carvalho, AGO^{1,3}; Bertani, GR²; Gil, LHV³

¹Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE;

²Departamento de Bioquímica Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE;

³Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife - PE.

amanda2307@gmail.com

Palavras-chave: Flavivírus; diagnóstico diferencial, vírus oeste do Nilo, vírus da febre amarela, genética reversa.

Os Flavivírus estão entre os arbovírus emergentes mais importantes do mundo. No Brasil, já foi reportado a circulação de 13 flavivírus diferentes e recentemente o vírus do Oeste do Nilo (WNV) foi encontrado em equinos, alertando a necessidade de uma implantação de diagnóstico diferencial de outros flavivírus brasileiros, como, o vírus Ilhéus (ILHV), o vírus encefalite São Luís (SLEV) e o vírus Rocio (ROCV). O objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de diagnóstico sorológico diferencial em NB2 para o monitoramento de flavivíroses emergentes no Brasil utilizando como ferramenta vírus quiméricos construídos por genética reversa. Para este fim, foram construídos três vírus quiméricos substituindo as proteínas estruturais de pré-membrana e envelope do vírus da Febre Amarela (YFV) pelas dos SLEV, ILHV e ROCV. Os RNAs dos vírus recombinantes construídos, transcritos *in vitro*, foram transfectados em células BHK-21 e observou-se o efeito citopático e imunofluorescência (IFA) em 48, 72 e 96 horas. A confirmação da replicação das quimeras construídas se deu por IFA e RT-PCR após três passagens em cultura de células. O fenótipo viral, como esperado, mostrou uma replicação mais lenta dos vírus construídos em relação ao vírus parental. A triagem sorológica inicial foi feita por ELISA de captura para a quimera YFV-WNV, construída previamente em nosso laboratório. Vinte e cinco amostras de soros equinos americanos foram testadas para a detecção de anticorpos IgM e IgG contra o WNV, sendo destas 25, 12 amostras IgM positivas e 20 amostras IgG positivas. Também foram testadas 164 amostras de equinos do Estado de Pernambuco, sendo 44 IgM positivos e 31 IgG positivos para WNV. Anticorpos neutralizantes para os vírus YFV17DD, dengue sorotipo 2, WNV, ILHV, ROCV e SLEV estão sendo pesquisados nas amostras positivas no ELISA através do teste PRNT, afim de se obter um diagnóstico sorológico diferencial para estas flavivíroses. O estabelecimento desse método de diagnóstico diferencial para flavivírus utilizando vírus vivos quiméricos atenuados será de grande valia para a implantação desses testes em laboratórios de nível NB2 e para um melhor monitoramento da circulação desses vírus no Brasil.

Apoio Financeiro: FACEPE, CNPq

Expressão heteróloga de biossurfactantes identificados em bibliotecas metagenômicas.

Araújo, SCS; Silva-Portela, RCB; Nicolini, F; Silva, UB; Melo, AJ; Agnez-Lima, LF.

Laboratório de Biologia Molecular e Genômica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

lfagnez@ufrnet.br

Palavras-chave: Metagenômica, biossurfactantes, proteína hipotética, degradação de hidrocarbonetos, bioinformática.

Os microrganismos apresentam uma imensa diversidade genética e estão presentes em toda biosfera, no entanto estima-se que apenas 1% das espécies pode ser cultivada por técnicas laboratoriais padrão. Dentro dessa diversidade existe um enorme *pool* genético e biológico a ser explorado. A metagenômica tornou possível o acesso direto ao genoma microbiano derivado de amostras ambientais. A metodologia permite obter informação funcional de proteínas, assim como a identificação de potenciais produtos com interesse biotecnológico e de novos recursos biológicos industrialmente exploráveis, a exemplo de novas soluções para impactos ambientais. Áreas contaminadas com petróleo são caracterizadas por um grande acúmulo de hidrocarbonetos e os surfactantes são utilizados como coadjuvantes em biorremediação. Sendo assim, a abordagem metagenômica foi utilizada para selecionar genes envolvidos no processo de degradação e emulsificação de hidrocarbonetos. Em um trabalho anterior, o DNA ambiental (eDNA) foi extraído de amostras de solo coletadas em duas diferentes áreas (Caatinga e de um rio salino) do Rio Grande do Norte (Brasil), as bibliotecas metagenômicas foram construídas e analisadas funcionalmente. Os clones capazes de degradar o óleo foram avaliados quanto à capacidade de sintetizar biossurfactante. Vários clones foram analisados e sequenciados e um clone revelou uma ORF com 897 pb, 298 aminoácidos, referente uma proteína de peso molecular próximo a 34 kDa. A busca por homologia no *GenBank* revelou similaridade com a sequência que codifica uma proteína hipotética de representantes da família *Halobacteriaceae*, que foram mostradas recentemente como produtoras de biossurfactantes. A presença da sequência codificante inserida e do fenótipo adquirido foram confirmadas. *Primers* foram desenhados e suas ORFs amplificadas por PCR. Em seguida, foram subclonadas em vetor de expressão pETDuet-1, contendo uma cauda de histidina, para expressão e posterior purificação da proteína de interesse. Os testes de emulsificação, atividade emulsificante e degradação de hidrocarbonetos foram realizados para confirmação da atividade e apresentaram resultados positivos. O ensaio de imunodeteção (*western blot*) com a utilização do anticorpo monoclonal *Anti-His*[®] confirmou a presença da proteína ambiental. Esse estudo foi o primeiro a relatar uma possível proteína com atividade biossurfactante obtida a partir de uma abordagem metagenômica.

Apoio financeiro: CNPq.

Protein expression profile associated with Glycolysis pathway in response to nitrate assimilation in *Dekkera bruxellensis*

Neto, AGB^{1,2}; Souza, GHMF³; Calsa Jr., T^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Genética, UFPE, Recife, Brasil; ²Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, UFPE, Recife, Brasil; ³Centro de Inovação em Espectrometria de Massas, Waters Corporation, Rio de Janeiro, Brasil
nettobiologo@hotmail.com

Keywords: yeast contaminant, nitrogen source, fermentation, proteome, enzymes.

Dekkera bruxellensis is major contaminant yeast in industrial bioethanol production of Brazil, able to assimilate nitrate in the final stage of fermentation, favouring their growth. The ability to override the yeast population in the process, *Saccharomyces cerevisiae*, turns out to be the molecular level investigation a priority. In this context, this work is planned to investigate the interference of nitrate assimilation in carbohydrate metabolism, concluding that the Custer effect is inhibited by different products and fermentation patterns in yeast *D. bruxellensis*. This study evaluated the accumulation profile of proteins (enzymes) associated with glycolysis in the yeast *D. bruxellensis* grown in nitrate-containing medium, using ammonium as reference. The *D. bruxellensis* GDB248 strain was grown in: (i) synthetic liquid medium DB-complete (ammonium); and (II) synthetic liquid medium Db-nitrate (nitrate) at 33 ° C, in shaker at 150 rpm, in triplicate, until the exponential growth phase. The samples were frozen in liquid N₂ and then protein extraction was performed by SMP method. Protein samples (100 µg) were digested with trypsin in the presence of RapiGest SFTM (Waters, USA), and subjected to label-free shotgun proteomics analysis performed in Synapt G2-S[®] mass spectrometer (Waters, UK). The proteins were putatively identified from peptides through HDMSE acquisitions (ion mobility multiplex MS/MS). The glycolysis-associated proteins/enzymes were functionally mapped using Blast2GO software and adjusted manually. To evaluate the differential expression the t-test was applied. Thirty enzymes associated with the assimilation of sucrose and glycolysis pathway were mapped, and only 9 of them showed no significant differences. Ten enzymes were induced in nitrate condition, among them: one alcohol dehydrogenase (EC: 1.1.1.1 or EC: 1.1.1.2), an ethanol precursor; two aldehyde dehydrogenase (EC: 1.2.1.3), an acetate precursor; and a glycerol-3-phosphate dehydrogenase (EC: 1.1.1.8). These enzymes may be associated with the accumulation of these products, preliminarily corroborating the hypothesis of Custer effect suppression in response to nitrate assimilation. The enzymatic activity and metabolic investigation will contribute to the understanding on nitrate assimilation effects to carbohydrate metabolism in *D. bruxellensis* yeast.

Financial Support: Waters do Brasil, UFPE, UPE, CAPES, INCT Bioetanol, FAPESP and CNPq.

Prospecção de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle biológico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar

Martins, PGS¹; Castelletti, CHM²; Silva, FAC¹; Lira Neto, AC²; Calsa Junior, T¹

¹Departamento de Genética, CCB, UFPE, Recife, PE; ²Instituto Agronômico de Pernambuco, IPA, Recife, PE

paulo_geo@yahoo.com.br

Palavras-chave: Lepidoptera, entomopatígeno, Cry toxinas, genes *cry*, controle biológico

A cultura da cana-de-açúcar possui importância econômica para Pernambuco e para o Brasil pela produção de, principalmente, açúcar e etanol. No entanto, parte da produção é perdida devido ao ataque de insetos-praga, destacando-se a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) cujo ataque causa perdas econômicas para o setor sucroalcooleiro. O controle de pragas através de inseticidas químicos pode causar danos à saúde humana e ao meio ambiente, sendo necessários métodos alternativos para o controle de insetos-praga. Neste contexto, o controle biológico alternativo ao controle químico consiste no emprego de inimigos naturais como parasitóides, predadores ou patógenos que promovem a regulação da população de insetos-praga a níveis não-prejudiciais. Dentre estes patógenos destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) que produz toxinas codificadas pelos genes *cry* no formato de cristais protéicos com atividade entomotóxica para diversas ordens de insetos. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e caracterização de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* com potencial entomotóxico para controle biológico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar. Foram coletadas amostras de solo que resultaram no isolamento de 97 colônias bacterianas, sendo 28 originárias do Estado da Bahia (Chapada Diamantina) e 69 do Estado de Pernambuco (municípios de Brejão, Primavera e Recife). As colônias obtidas apresentaram características fenotípicas, presença de esporos e cristais protéicos compatíveis com os descritos para Bt. O DNA total foi extraído usando o Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) conforme recomendações do fabricante, quantificado em espectrofotômetro Qubit® (Invitrogen™) e em seguida utilizado para ampliações com *primers* universais para os genes *cry1*, *cry2* e *cry9*, ativos contra dípteros e lepidópteros. Durante as ampliações não houve detecção de genes *cry1* nos isolados; no entanto, 11,35% e 12,4% apresentaram fragmentos com padrões estimados na literatura para os genes *cry2* e *cry9*, respectivamente. As ampliações evidenciaram distinção na distribuição dos genes de forma dependente da região geográfica de origem dos isolados, uma vez que todos os que apresentaram o gene *cry2* são oriundos de Pernambuco enquanto que os portadores de genes *cry9* são originários da Bahia. A presença de genes *cry2* e *cry9* entre os isolados analisados torna-os possíveis candidatos a apresentarem toxicidade contra a ordem de insetos Diptera e também Lepidoptera, a qual pertence a *Diatraea saccharalis*.

Suporte financeiro: CAPES

Produção da glicoproteína c-recombinante do vírus da Laringotraqueíte das aves em *Escherichia coli*

Gomes, LRS¹; Silva, JG¹; Jesus, ALS¹; Fontes, KFLP¹; Freitas, AC²; Castro, RS¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE, UFRPE, Brasil; ²Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, UFPE, Brasil

jackygs@gmail.com

Palavras-chave: Laringotraqueíte, aves, glicoproteína C, recombinante, *Escherichia coli*.

A infecção causada pelo vírus da laringotraqueíte (VLT) causa severas perdas econômicas para avicultura, com uma alta taxa de mortalidade de 30% a 70% nas aves infectadas. O VLT é conhecido como Herpesvírus dos galídeos tipo 1, pertence à família Herpesviridae e ao gênero Iltovírus. Este tipo viral possui tropismo pelo epitélio do trato respiratório, provocando infecção aguda na laringe e na traqueia das aves. O genoma viral, com tamanho de 150 kb, apresenta genes que codificam glicoproteínas que funcionam como fatores de virulência, maturação dos vírions e com função do reconhecimento celular no hospedeiro. A glicoproteína C (gC) é a mais imunogênica do VLT e tem sido alvo para a proteção vacinal e o diagnóstico da infecção. O diagnóstico da LTI não somente deve detectar a presença do vírus, mas também diferenciar a ave infectada de outras doenças que apresentam semelhantes sinais clínicos. Isto remete à utilização de uma ferramenta para auxiliar o seu diagnóstico laboratorial. O objetivo desse estudo foi produzir a gC-recombinante em sistema procarioto, utilizando a *Escherichia coli* como hospedeiro. Para tanto, uma porção do gene que codifica a gC foi sintetizado e clonado em vetor pAE para sua expressão em linhagem BL-21 de *E. coli* a fim de produzir a gC-recombinante. A indução do cassete de expressão gC/pAE foi feita por IPTG (0,2 mM), 250 C, por 4 horas. O cassete de expressão gC/pAE foi confirmado após reconhecimento das enzimas (*XhoI/KpnI*) com a subsequente liberação do inserto na altura de 630 pb e por sequenciamento. No extrato proteico da cultura induzida, foi detectada uma proteína de ~23 kDa por western blot utilizando anticorpo contra tag de histidina fusionada à proteína. Estes dados demonstra a produção eficiente da proteína recombinante em *E. coli*, com a perspectiva da gC-r ser utilizada como antígeno para detecção de anticorpos em aves naturalmente infectadas com o VLT.

Diversidade genética de isolados intraespecíficos de *Sclerotium* coletados em áreas de produção brasileiras

Guerra, YL¹; Rocha, GMG²; Pinto, FSL³; Lima, LM⁴; Santos, RC⁴; Melo Filho, PAMF⁵

¹Doutoranda em Melhoramento Genético de Plantas, UFRPE; ²Mestranda em Ciências Agrárias, UEPB; ³Técnica do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão; ⁴Pesquisadora da Embrapa Algodão; ⁵Professor da UFRPE.

geisenilma@hotmail.com

Palavras-chave: Patogenicidade, Fungo, Filogenia, Variabilidade, Disseminação.

O gênero *Sclerotium* possui mais de 40 espécies e seus patógenos causam severos danos a diversas lavouras nas regiões tropical e subtropical, manifestados como podridão de raízes e do colo, murcha e tombamento de plântulas. As variações intraespecíficas nos padrões morfológicos e fisiológicos, regiões de ocorrência e hospedeiros são oriundas da fase de formação do patógeno, que pode ser via reprodução assexuada ou sexuada (rara ocorrência). Os patógenos oriundos de reprodução assexuada infectam mais de 500 espécies de plantas e ocorrem em todas as regiões produtoras do mundo. Para elaborar estratégias eficientes de manejo, conhecer a variabilidade genética do patógeno é de suma importância. Portanto, a partir da coleção de 178 acessos de *S. rolfsii* da UFRPE foram selecionados 14 isolados coletados nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sul para analisar a diversidade genética, utilizando marcadores ISSR. A seleção desses isolados baseou-se na localização geográfica e patogenicidade em várias culturas agrícolas, como feijão caupi, tomate, pimentão e girassol. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e incubados em B.O.D. por quatro dias a 28 °C. O DNA genômico foi extraído com o kit DNA *Easy* (Invitrogen) e alíquotado para as reações de PCR, nas quais foram utilizados onze *primers* ISSR. Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose 1,5% e fotodocumentados para a análise genética. Os *amplicons* foram codificados em uma matriz de dados binários para determinação da similaridade genética entre cada par de acessos, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. A partir da matriz de similaridade genética foi feita a análise de agrupamento, via dendrograma, com o auxílio do programa NTSYS-PC 2.10, utilizando, como critério de agrupamento, o método baseado na distância média (UPGMA). Os dados foram processados pelo aplicativo computacional GENES, versão 2007. Dos *primers* analisados, dez geraram *amplicons* com perfis confiáveis para a análise genética dos acessos. Os isolados mais próximos foram SR7 (Manaus-Am) e SR9 (Itaberaí-Go) com mais de 70% de similaridade, os quais foram agrupados em um único clado. Não foram observadas maiores semelhanças entre os demais isolados, porém o isolado SR5 (Cristalina-Go) foi o mais divergente dentre os demais, sendo agrupado em um clado isolado. Considerando-se a filogenia obtida pelo dendrograma, associada às características morfológicas, sugere-se que o isolado SR5 possa ser uma das variações do gênero *Sclerotium*, possivelmente o *S. rolfsii* var. *delphinii*, o qual é bastante semelhante ao *S. rolfsii*.

Suporte financeiro: Rede Repensa/CNPq/Embrapa e CAPES

Análise filogenética e teste de patogenicidade em isolados *Colletotrichum gossypii* fs. *cephalosporioides*, agente causador da ramulose no algodoeiro

Veiga, KPS¹; Guerra, YL²; Melo Filho³, PA; Pinto, FSL⁴; Lima, LM⁴; Santos, RC⁴.

¹Doutoranda em biotecnologia RENORBIO/UFRPE, Recife –PE; ²Doutoranda em Melhoramento genético de Plantas, UFRPE, Recife –PE; ³Professor do departamento de Agronomia, UFRPE, Recife –PE; ⁴Embrapa algodão CNPA, Campina Grande -PB

kalinyveiga@hotmail.com

Palavras-chave: Algodão, fungo, patógeno, filogenia, ISSR

O algodoeiro é uma importante fibrosa plantada em mais de 100 países do mundo. O Brasil é um dos principais produtores, contudo, o manejo é um dos mais onerosos em função dos elevados custos especialmente para controle de pragas e doenças. A lavoura do algodão é afetada por mais de 250 doenças, 90% causadas por fungos. A ramulose, causada pelo fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, é uma das principais doenças em várias regiões brasileiras, ocasionando danos nas folhas jovens, escurecimento das hastes principais e laterais, manchas necróticas circulares, antracnose e tombamento. Plantas infectadas antes do florescimento abortam as estruturas florais e ocorre a redução da produção de capulhos e do porte da planta. Neste trabalho procedeu-se um estudo filogenético, por meio de marcadores ISSR, entre isolados do fungo todos coletados em zonas produtoras de algodão em Mato Grosso e pertencentes a Coleção de Culturas de Microrganismos Patogênicos do CNPA (CCMF-CNPA). Inicialmente, avaliou-se a patogenicidade dos isolados em casa de vegetação, de modo a atestar a existência de variabilidade, confrontada com os ensaios moleculares. Para as reações de ISSR, 28 primers foram utilizados em reações de PCR, com anelamento a 45 °C. Após análise dos géis (agarose, 0,8%) em fotodocumentador, os produtos da amplificação foram codificados em uma matriz de dados binários para estimativa da similaridade genética, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. A partir da matriz de similaridade genética foi feita a análise de agrupamento, com o auxílio do programa NTSYS-PC 2.10, utilizando como critério o método baseado na distância média (UPGMA). Para os testes de patogenicidade, folhas de plantas jovens de algodão BRS 8H foram feridas com um abrasivo e pulverizadas com uma suspensão de conídios de *C. gossypii* (1 x 10⁶ conídios/mL). A análise de patogenicidade foi realizada após 15 dias por meio de uma escala de notas. Dos 28 primers testados, 14 geraram amplificações em todos os isolados. Quatro grupos foram formados no dendrograma, sendo três constituídos por apenas um isolado e um contendo os quatro que foram os mais agressivos nos testes de patogenicidade, revelando índice de doença de 80% (CCMF-CNPA055), 93% (CCMF-CNPA058), 79% (CCMF-CNPA060) e 53% (CCMF-CNPA061). Esses três primeiros, apresentaram índice de similaridade acima de 80%, sendo, portanto, muito próximos geneticamente. Os demais isolados, que se mantiveram distantes desse grupo, apresentaram índice de doença abaixo de 50%, sendo IMA 117 o mais afastado dos demais, revelando índice de doença de apenas 26%. Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram identificar primers ISSR responsivos para auxiliar na identificação de isolados patogênicos de *C. gossypii* fs. *Cephalosporioides*. Os primers de maior polimorfismo (UBC-884, UBC-888 e UBC-890) foram mais ricos nas bases AG, AC e GC, podendo esses serem utilizados como recursos moleculares de seleção para o referido fungo.

Suporte financeiro: Rede REPENSA/Embrapa/CNPq e CAPES

Uma nova exonuclease relacionada a reparo de DNA obtida a partir de uma biblioteca metagenômica

Rita C.B.Silva-Portela¹, Robert P. Fuchs² e Lucymara F. Agnez-Lima¹.

¹Departamento de Biologia Celular e Genética, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 59072-970, Brasil; ²Genome Instability and Carcinogenesis, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche 3081, 13402 Marseille, France.

lfagnez@ufrnet.br

Palavras-chave: Metagenoma, reparo de DNA, exonuclease

Apesar da importância dos mecanismos de reparo de DNA para a manutenção da integridade genômica nosso conhecimento sobre mecanismos de reparo de DNA é baseado em organismos modelo como *Escherichia coli* e pouco é conhecido sobre os organismos de vida livre e não cultivados. A abordagem metagenômica permite o acesso ao material genético de microrganismos não cultivados e tem sido usada para identificação de novos genes. Neste contexto, a abordagem metagenômica foi aplicada neste trabalho para descobrir novos genes envolvidos com a manutenção da integridade genômica. A partir do DNA ambiental extraído de amostras de solo, foi construída uma biblioteca metagenômica a qual foi funcionalmente analisada, utilizando meio seletivo contendo H₂O₂. O clone metagenômico selecionado foi capaz de complementar a deficiência em reparo de DNA de cepas simples e duplo-mutantes de *E. coli* (*recA* e *xthA nfo*, respectivamente), submetidas ao estresse gerado por H₂O₂ e MMS. A análise de sequência mostrou uma ORF codificando para uma proteína hipotética membro da superfamília Exonuclease_Endonuclease_Phosphatase (PF03372). Assim, uma nova nuclease foi identificada e experimentalmente caracterizada *in vivo* e *in vitro*. Testes específicos utilizando a nuclease purificada e oligonucleotídeos fluorescentemente marcados revelaram sua atividade 3'-5' exonuclease, em substratos simples e dupla-fita, dependente de Magnésio e sensível a EDTA. Este é o primeiro relato e caracterização de uma enzima obtida a partir de abordagem metagenômica, mostrando uma atividade exonuclease, relacionada a reparo de DNA.

Suporte financeiro: CNPQ e Capes

Importância da detecção de AmpC em amostras comunitárias de *Pseudomonas aeruginosa*

OLIVEIRA, T. A.¹; COSTA, R. G. Q.¹; APOLINÁRIO, N.M.¹; SILVA, I. C.¹; BRITO, L. F.¹; MOURA, W. C. S.¹; PEREIRA, D. N.¹; LIMA, Z. N.¹.

¹Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, PB.

rayanequeiroga@hotmail.com

Palavras-chave: beta-lactamase, fenótipos, resistência

As beta-lactamases do tipo AmpC, produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*, são enzimas mediadas por genes cromossomais que podem conferir resistência a quase todos os antibióticos beta-lactâmicos, incluindo as cefamicinas, as cefalosporinas de terceira geração, as penicilinas de amplo espectro, as combinações com inibidores de betalactâmicos, os monobactâmicos e os carbapenêmicos. São produzidas também por outros gêneros de importância clínica como as bactérias do grupo CESP (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp.) e *Morganella morganii*. A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista que exibe resistência intrínseca a muitos antimicrobianos, podendo adquirir resistência mobilizável por vetores, como plasmídeos e transposons conjugados à genes que conferem produção de substâncias pseudomonicidas. Esta característica natural se combina à índices de mortalidade e bacteremia secundária aumentados. Com um dos maiores genomas do mundo procariótico, 5.570 orf (*open reading frames*), a *P. aeruginosa* pode expressar-se geneticamente tanto de forma indutiva, quando a bactéria é exposta a um indutor enzimático, quanto de forma constitutiva, ou seja, sem a necessidade de um agente indutor. Devido a essa versatilidade de mecanismos de resistência o trabalho tem por objetivo verificar em amostras comunitárias de *P. aeruginosa*, a produção de beta-lactamase do tipo AmpC e os seus respectivos fenótipos. Fizeram parte do estudo todas as estirpes isoladas das culturas de urina, orofaringe e ouvido, sendo analisados os resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, seguindo os padrões interpretativos do documento M100-S18 do CLSI (*Clinical Laboratory Standard and Institute*). Em 58,33% das cepas isoladas de urina e em 50% de orofaringe detectou-se a produção de AmpC, enquanto que nas secreções de ouvido este fenótipo não foi detectado. Apesar das beta-lactamases do tipo AmpC estarem disseminadas em todo o mundo, são insuficientes os estudos à respeito destas enzimas, demandando a padronização de um método para sua detecção, a fim de que sejam evitadas falhas terapêuticas relacionadas ao uso indevido dos antimicrobianos, auxiliando assim numa melhor interpretação do antibiograma destes isolados e contribuindo para o uso racional de antibióticos.