



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

CONGRESSO DO ICB 55 anos

03, 04 e 05 de Setembro de 2024

Livro de Resumos



CONGRESSO DO ICB 55 anos

03, 04 e 05 de Setembro de 2024

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Junior

Reitor

Profa. Dra. Maria Arminda do Nascimento Arruda

Vice-Reitora

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Profa. Dra. Patricia Gama

Diretora

Prof. Dr. Carlos Pellescho Taborda

Vice-Diretor

COMISSÃO ORGANIZADORA

Amanda Nogueira Campos

Ana Isabel Ferraz

Beatriz Stolf Carboni

Carla Roberta Oliveira Carvalho

Carlos Pelleschi Taborda

Carolina Demarchi Munhoz

Claudio Romero Farias Marinho

Dania Emi Hamassaki

Fabiana Barboza de Moraes

Fábio Siviero

Katia Valtrudes Sendeveski Melo

Luciana dos Santos Gonçalves

Luciana Venturini Rossoni

Luiziana Ferreira da Silva

Maria Cristina Ribeiro Freire

Marilene Guimarães

Marília Pereira Oliveira

Monica Raquel Penayo Chamorro

Patrícia Gama

Vanessa Moraes Freitas

Wothan Tavares de Lima

COMISSÃO CIENTÍFICA

Andrea Balan Fernandes

Beatriz Stolf Carboni

Carla Roberta Oliveira Carvalho

Carlos Pelleschi Taborda

Carolina Demarchi Munhoz

Fábio Siviero

João Agostinho Machado Neto

Patrícia Gama

Vanessa Moraes Freitas

APOIO INSTITUCIONAL

FAPESP

Programas de Pós-Graduação

Biologia de Sistemas, Farmacologia, Fisiologia Humana, Imunologia, Microbiologia,
Parasitologia, Mestrado Profissional Inovação em Diagnósticos e Desenvolvimento de

Fármacos e Medicamentos

Organização

ICB, FUSP e Interevent

INDICE

DEPARTAMENTO/CATEGORIA	PÁGINA
ANATOMIA	06 A 42
BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO	07 a 74
FARMACOLOGIA	75 a 141
FISIOLOGIA E BIOFÍSICA	142 a 164
IMUNOLOGIA	165 a 196
MICROBIOLOGIA	197 a 259
PARASITOLOGIA	260 a 293
ESTUDANTE DE GRADUAÇÃO	294 a 299
OUTROS	300 a 309

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA

EFFECT OF ACUTE SYMPATHETIC HYPERACTIVITY IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS PROGRESSION

Lopes, G. S., Ramalho, L. S., Krum, B. N., Bechara, L. R. G, Ferreira, J. C. B. Department of Anatomy. Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (ICB-USP).

Background and Aim: Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects 800 million of people in the world. ALS patients display a progressive motor disorder after the onset of the disease, characterized by muscle spasticity, muscle atrophy and respiratory failure. Several studies have suggest that around 50% of patients have non-motor symptoms, indicating that other systems might be related to the pathophysiology of ALS. Autonomic dysfunction is detectable in 75% of ALS patients and experimental models have reported symptoms related to sympathetic hyperactivity, as seen in other disorders such as Parkinson's and Alzheimer's disease, raising the hypothesis that dysfunction in other systems might contribute to the onset and progression of ALS. Thus, the objective is to test the effect of acute sympathetic hyperactivity induced by isoproterenol (a beta adrenergic receptor agonist) in the progression of ALS, using genetically modified male mice that develop ALS as a result of overexpression of the mutant enzyme human SOD1-G93A.

Methodology and Results: We used Wild type and B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J (SOD) male mice, which were treated with vehicle (saline) or isoproterenol by intraperitoneal injection (200mg/kg body weight). This animals were randomized into four groups (n=6 per group): WT+vehicle (WT Veh); WT+isoproterenol (WT Iso); SOD+vehicle (SOD Veh); SOD+isoproterenol (SOD Iso). During the early and end symptomatic states of ALS, we evaluated a series of behavioral and functional analysis, including: grip strength, wire hanging test, rotarod and open field test (CEUA: 1365200922).

The behavioral and functional analysis revealed that SOD Veh and SOD Iso mice presented a significant weight loss from day 130 to day 150 (-15%), a decrease in latency to first fall in the wire hang test from day 80 to day 150 (-50%), a increase of number of falls and a reduced latency to first fall in rotarod test on day 150 (-40%) compered to WT Veh and WT Iso (p=0.04). These alterations were followed by a decrease in grip strength test (-20%), loss in muscle strength (-50%), an increase in immobility time performed in open fiel test (-60%) and a reduction of the stride distance in ambulation test performed by foot-print on day 150 (-20%) compared to WT Veh and WT Iso (p=0.03). When we compared these alterations between WT Veh and WT Iso, and SOD Veh and SOD Iso, there were no difference among the groups.

Conclusion: Collectively, our preliminary findings demonstrate that ALS mice present behavioral and functional features of ALS and the acute sympathetic hyperativity didn't have a significant effect in ALS progression.

Financial support: FAPESP 2022/08635-4

Anatomical and functional study of the gabaergic and glutamatergic cell groups in the cuneiform nucleus. Ikebara, J.M.; Corrêa, B.R.; Takeda, A.F.A.; Domingues, K.; Melleu, F.F.; Canteras, N.S., Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction and objectives: The cuneiform nucleus (CUN), traditionally associated with locomotor activity. However, some studies have shown that CUN has strong bidirectional links with the dorsolateral periaqueductal gray (dIPAG) and shares a similar source of inputs involved in integrating information related to life-threatening events. Indeed, CUN opto-stimulation generates innate freezing and flight antipredator response in rats. In this way, employing track-tracing, optogenetics, and calcium imaging experiments, we investigated differential role of glutamatergic (Glu) and GABAergic (GABA) neurons within CUN in transgenic mice.

Methods and Results: Vglut2-Ires-Cre and VGAT-cre mice were used for all experiments. A stereotaxic surgery was performed to inject a vector viral for the following experiments: Tracing AAV-DIO-EYFP; Optogenetics: AAV-DIO-ChR2-EYFP; Fiberphotometry: AAV-DIO-GCamp6s, into the CUN. Tract-tracing unveiled similar projections of Glu and GABA to the dorsolateral PAG, but divergence in their connections to the hypothalamus. Glutamatergic neurons projected to the ventro-medial hypothalamic nucleus, while GABAergic neurons targeted the anterior hypothalamic nucleus. Opto-stimulation during an open field generates freezing and flight. Real-time place preference (RTPP) opto-stimulation, used to evaluate if the stimulus is aversive, indicated that Glu activation prompted an aversive response, contrasting with the unaltered state observed in GABA stimulation. However, neither Glu nor GABA seemed implicated in the acquisition of learned fear responses, as evidenced by contextual place preference tests. Further insights emerged from fiber photometry data, revealing the nuanced roles of Glu and GABA in looming stimulus and predator exposure. Glutamatergic neurons exhibited heightened activity during looming perception and escape behavior in predator exposure, while GABAergic neurons were more closely associated with exploratory behaviors. The procedures are approved by the Animal Ethics Committee.

Conclusion: These findings suggest a complementary dynamic between the two cell populations within CUN, contributing to the overall response in threatening contexts.

Financial Support: Fapesp 22/06044-9, 22/16318-9, 17/12881-2, 22/14359-0

BUTYRATE PRODUCED BY GUT MICROBIOTA PROTECTS MYENTERIC NEURONS LOSS FOLLOWING EXPERIMENTAL ULCERATIVE COLITIS BY REDUCING TNF- α

Caetano, M.A.F¹, Souza, R.F.¹, Duarte, J.R.L.¹, Castelucci, P.¹

¹Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.

Introduction and Aims: The enteric nervous system is affected by inflammatory bowel diseases. Butyrate, a short-chain fatty acid produced by gut microbiota, binds to GPR43 receptor, reducing the production of pro-inflammatory cytokines such tumor necrosis factor-alpha (TNF- α). This work aimed to explore GPR43 and Butyrate's effects on myenteric neurons in experimental ulcerative colitis (EUC). **Methods:** C57BL/6 male mice received intrarectal injection of 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic-acid (TNBS group). SHAM group received vehicle (ethanol 35%). After EUC induction, some animals were treated for 7 days with Butyrate (100mg/kg-Butyrate group) via gavage. The other groups received saline (CEUA-ICB/USP-5482071122). Colon was collected 7 days post-TNBS and processed for immunofluorescence double labeling for GPR43 with Calretinin (Calr) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS). Double labeling of TNF- α with Calr and nNOS was also performed. The number of neurons/ganglia immunoreactive(-ir) for GPR43, Calr, and nNOS, and fluorescence intensity (CTCF) of these neurons and of TNF- α were analyzed. **Results:** Colocalization of GPR43 with Calr-ir and nNOS-ir neurons, and of TNF- α with Calr-ir, nNOS-ir was observed. TNBS reduced GPR43-ir (20.3%), Calr-ir (38.5%), and nNOS-ir (41.1%) neurons compared to SHAM group. Butyrate treatment restored these neurons by 20.9%, 35.4%, and 38.3%, respectively. TNF- α CTCF increased by 40.6% in TNBS group and decreased by 27,7% in Butyrate group compared to TNBS group. There was a CTCF reduction of GPR43 (28.4%) in TNBS group, and an increase by 35.7% in Butyrate group compared to TNBS group. Calr and nNOS CTCF had no difference between groups. **Conclusion:** Butyrate protects neuronal loss and reduces TNF- α production in EUC.

Keywords: Inflammatory Bowel Disease; Enteric Nervous System; Gut Microbiota; Free fatty acid receptor; Tumor necrosis factor-alpha.

Financial Support: FAPESP (2022/00086-1; 2022/14406-8) and CAPES.

EFFECT OF CHRONIC SYMPATHETIC HYPERACTIVITY IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

Ramalho, L. S., Lopes, G. S., Bechara, L. R. G., Jesus, I. C. G., Krum, B. N., Nascimento-Carvalho, B., Silva, M. B., Irigoyen, M. C., Moreira, T. S., Ferreira, J. C. B. Department of Anatomy. Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (ICB-USP)

Background and Aim: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is characterized by a progressive and intrinsic neuromuscular degeneration. Studies have shown that patients and experimental models of ALS can display autonomic imbalance, as result of hyperactivation of the SNS. These clinically relevant but still neglected finding suggest that increased SNS activity is involved in the pathophysiology of ALS, as seen in other degenerative disorders such as Parkinson and Alzheimer diseases. Thus, our aim is to test the effect of chronic sympathetic hyperactivity induced by isoproterenol (a beta adrenergic receptor agonist) in the progression of ALS, using genetically modified male mice that develop ALS as a result of overexpression of the mutant enzyme human SOD1-G93A.

Methodology and Results: We used Wild type (C57BL6/J) and SOD (B6.Cg-Tg (SOD1*G93A)1Gur/J) male mice, which were treated with saline or isoproterenol by intraperitoneal injection (10mg/kg/day). This animals were randomized into four groups (n=8 per group): WT+saline (WT Sal); WT+isoproterenol (WT Iso); SOD+saline (SOD Sal); SOD+isoproterenol (SOD Iso). During the early and advanced symptomatic states of ALS, we performed the phenotypic characterization and evaluated behavioral and functional analysis, including: grip strength, wire hanging test, Rotarod test and *ex vivo* maximal muscle force (CEUA: 1365200922).

The data obtained from the behavioral tests revealed there was no statistical difference between control animals (WT Sal and WT Iso). However, the behavioral analysis showed that SOD Iso group during disease progression presented a progressive decline in latency to first fall in the wire hang test (-33%; $p < 0.03$) and Rotarod test (-66%; $p < 0.02$), an increased of number of falls in Rotarod test (+70%; $p < 0.04$) and also had reduced forelimb grip strength (-55%; $p < 0.03$) compared to SOD Sal. These changes in SOD Iso were also accompanied by decrease in the *ex vivo* maximal muscle force (-44,8%; $p < 0.01$) and there was no difference in tibialis anterior myofiber cross-sectional area and collagen deposition compared to SOD Sal. Interestingly, we found a significant increase in GFAP immunoreactivity (+70%; $p < 0.05$), and the Nissl staining of lumbar spinal cords revealed there was no statistical difference between SOD Iso compared with SOD Sal.

Conclusion: Collectively, our preliminary findings demonstrate that the chronic treatment with isoproterenol promotes behavioral and functional changes in ALS mice and suggest that increased sympathetic tone might be involved in the pathophysiology of ALS.

Financial support: Processo FAPESP 2022/08635-4

ANÁLISE DAS PRÁTICAS EDUCACIONAIS E TECNOLÓGICAS NO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

Takano, A.P.C.¹, Yan, C.Y.I.², Furlan, R.L.A.⁴, Abdulkader, F.³, Siviero, F.²

¹Departamento de Anatomia, ²Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento,

³Departamento de Fisiologia, ⁴Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

Introdução e Objetivos: O Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP) se destaca na produção de conhecimento e na formação de alunos das áreas da saúde e biológica. Para formar profissionais preparados, os professores e pesquisadores precisam se manter atualizados com os avanços em suas áreas e acompanhar os progressos na educação biomédica, adaptando-se às mudanças geracionais, tecnológicas e científicas que influenciam o processo de ensino e aprendizagem. O estudo investigou as metodologias de ensino dos docentes do ICB-USP, o uso de recursos tecnológicos e questões relacionadas ao contexto educacional em disciplinas do ciclo básico das áreas biológicas e da saúde.

Métodos e Resultados: O estudo transversal e descritivo, conduzido pelo Grupo de Apoio Pedagógico (GAP), utilizou um questionário enviado via Google Forms aos docentes ativos do ICB-USP, com uma taxa de resposta de 41,5%. O questionário incluiu questões em Escala de Likert e abertas sobre metodologias de ensino, metodologias ativas, ferramentas de ensino-aprendizagem, plataformas de gerenciamento de aprendizagem e metodologias de avaliação. A maioria dos docentes utiliza predominantemente aulas expositivas, com menor adesão a abordagens interativas. Professores entre 45 e 54 anos usam mais aulas expositivas com interações ativas. Entre os que aplicam metodologias ativas, debates em grupos e Problem-Based Learning são os mais utilizados, enquanto Think-Pair-Share e Peer Instruction são menos conhecidos. Os docentes reconhecem as vantagens do ensino ativo, mas mencionam desafios como falta de treinamento, tamanho das turmas e tempo para elaborar aulas com novas metodologias. Aqueles que desejam treinamento destacam a necessidade de infraestrutura, recursos tecnológicos adequados e reconhecimento institucional. A plataforma Google Classroom é a principal ferramenta para disponibilização de recursos didáticos e gerenciamento da aprendizagem. As metodologias de avaliação mais usadas são provas dissertativas e testes de múltipla escolha.

Conclusão: As práticas de ensino no ICB-USP ainda são predominantemente tradicionais, com forte presença de aulas expositivas, embora haja sinais de uma transição para métodos mais interativos e ensino ativo. Abordagens tecnológicas ainda não são amplamente conhecidas pelos docentes. Os achados deste estudo oferecem informações valiosas para futuras estratégias de aprimoramento do ensino no ICB-USP.

MITOFUSIN 1 AND 2 DELETION RESULTS IN EXTENSIVE MITOCHONDRIA-ER/SR REMODELING AND COMPROMISES SKELETAL MUSCLE FUNCTION

Scheffer D.L.¹, Bechara L.R.G.¹, Ribeiro M.A.C.¹, Meneses J.R.L.¹, Liang Y.², Qi L.², Ferreira J.C.B.¹

¹*Department of Anatomy, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil*

² *Molecular Physiology Group, Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia, Charlottesville, USA*

Introduction and Objectives: Impaired mitochondrial bioenergetics and defective endo/sarcoplasmic reticulum (ER/SR) function have been individually reported in skeletal muscle under degenerative conditions in both humans and rodents. However, the dynamic interplay between these two key organelles under physiological conditions as well as its contribution to skeletal muscle degeneration remain elusive. Here, we characterize the contribution of mitochondria-ER/SR communication to skeletal muscle biology and function in wildtype and mitofusin 1 and/or 2 knockdown mice. **Methods and Results:** Experiments were carried out with male mice aged 10-12 weeks in a temperature-controlled room on a 12-h light/dark cycle. *Mfn1/2^{f/f}* (control), *Mfn1^{f/f}/HSA^{Cre}*, *Mfn2^{f/f}/HSA^{Cre}* and *Mfn1/2^{f/f}/HSA^{Cre}* mice were treated for 2 weeks with Doxycycline (1 mg/mL) in 5% sucrose-supplemented drinking water for deletion of mitofusin 1 and/or 2 in the skeletal muscle, followed by 4 weeks of washout. Our findings demonstrate that combined skeletal muscle deletion of mitofusins 1 and 2, critical proteins involved in mitochondria-ER tethering, is sufficient to induce a severe reduction in skeletal muscle mass, contractility properties and running distance (~50% decrease) when compared with control littermates. In addition, conditional deletion of mitofusin 1 and 2 modifies mitochondrial and SR morphology, impairs calcium release units and induces changes in the levels of proteins involved in ER/SR calcium handling and ER stress in skeletal muscle. It is important to highlight that these transgenic mice do not display dysfunctional skeletal muscle mitochondrial bioenergetics in single fiber analysis. Of interest, *mfn1/2* KO mice display impaired neuromuscular junction and fiber type switching to an oxidative metabolism. The presence of a single mitofusin (either *Mfn1* or *Mfn2*) is sufficient to maintain those ER/SR changes described above. **Conclusions:** Together, these results place mitofusin 1 and 2 as critical players in (patho)physiological changes in skeletal muscle. Finally, unraveling the molecular mechanisms of mitochondrial-ER/SR signaling, and regulation will provide insights into the most fundamental cellular adaptive processes and perhaps uncover new druggable targets that will open up new strategies to treat skeletal muscle disease.

Financial support: FAPESP (2019/22204-3)

DELEÇÃO DAS MITOFUSINAS MITOCONDRIAIS PREJUDICA A FUNÇÃO MUSCULAR EM MODELO DE MIOPATIA MUSCULOESQUELÉTICA

**LAUREANO, J. R. M.; SCHEFFER, D. L. ; BECHARA, L. R. G. ;
FERREIRA, J. C. B.**

Instituto de Ciências Biomédicas/Departamento de Anatomia/Universidade de São Paulo

joneslaureano@usp.br

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A atrofia muscular esquelética, causada por processos degenerativos como o desuso, envolve a redução das fibras musculares e da capacidade contrátil. Em condições patológicas, a disfunção mitocondrial contribui para a progressão das doenças. A deleção das proteínas de fusão mitocondrial MFN1 e MFN2 em músculos causa atrofia e intolerância ao exercício em camundongos, e a mutação na MFN2 está ligada à doença Charcot-Marie-Tooth tipo 2A e miopatia esquelética.

Portanto o objetivo do presente estudo é investigar o papel das proteínas de fusão mitocondrial, mitofusinas 1 e 2 (Mfn1/2), no músculo esquelético com miopatia esquelética induzida pela constrição do nervo isquiático em camundongos.

MÉTODOS E RESULTADOS

Camundongos C57BL6 transgênicos para as Mfn1/Mfn2 (*Mfn1/2^{-/-}ACTA^{Cre}*) no músculo esquelético e controles (*Mfn1/2^{+/+}*) com 3 meses de idade foram utilizados neste estudo (CEUA nº 4244021020). A deleção

dos genes Mfn1/2 foram induzidos pelo tratamento com o antibiótico doxiciclina (1 mg/mL) por 2 semanas, seguido por 2 semanas sem tratamento. Após este período, foi realizada a cirurgia para constrição do nervo isquiático e a simulação nos animais controle (grupo Sham). Duas semanas após a cirurgia os animais foram eutanasiados e o músculo esquelético gastrocnêmio e extensor longo dos dedos (EDL) foram coletados para as análises. O músculo EDL foi posicionado verticalmente em uma cuba do sistema *ex vivo* (banho de órgãos) para análise da função muscular. O músculo gastrocnêmio foi pesado e imediatamente congelado em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas. Os resultados foram analisados por meio do teste-t de Student, considerando diferença estatisticamente significativa quando os valores foram de $p < 0,05$.

O músculo gastrocnêmio dos animais contendo a enzima Cre (*Mfn1/2^{-/-}ACTA^{Cre}*) apresentaram a excisão dos genes Mfn1/2. Em amostras da orelha e nos animais que não apresentavam a enzima Cre recombinase (*Mfn1/2^{+/+}*), a deleção não ocorreu. Nós também confirmamos a

eficiência do tratamento por meio da avaliação do conteúdo proteico de Mfn1 e 2 no músculo esquelético. Uma redução significativa na massa muscular do músculo gastrocnêmio foi observado nos animais mutantes, o qual foi agravada pela miopatia esquelética. Nós também observamos uma diminuição significativa na força muscular e na força máxima do músculo EDL dos grupos Sham com deleção de Mfn1/2 e miopatia esquelética. Quando a deleção foi combinada com a miopatia o prejuízo foi agravado impossibilitando a detecção da contratilidade.

CONCLUSÕES

A deleção combinada das mitofusinas 1 e 2 maximiza a disfunção do músculo esquelético sob condição patológica crônica. Esse conhecimento servirá como base para descobrir novos alvos terapêuticos que abrirão novas estratégias para tratar doenças do músculo esquelético.

APOIO FINANCEIRO

O presente projeto foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo); processo (2021/05746-7).

ANALYSIS OF MIGRATION OF HUMAN DENTAL PULP STEM CELL SPHEROIDS EMBEDDED IN HYBRID HYDROGEL FOR BONE TISSUE ENGINEERING

Fulfaro, F. N. O.¹, Rossi, A. M.², Granjeiro, J. M.³, Paiva, K. B. S.¹

1. Biology Laboratory of the Extracellular Matrix and Cellular Interactions (LabMec), Department of Anatomy, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo (USP), São Paulo/SP, Brazil
2. Brazilian Center for Physics Research (CBPF), Rio de Janeiro/RJ, Brazil
3. National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO), Duque de Caxias/RJ, Brazil.

Introduction and objectives

Dental pulp stem cells (DPSCs) in three-dimensional cell culture are attractive due to their features applied to Bone Tissue Engineering (BTE). In addition, a biomimetic matrix is necessary for personalized bone grafts. Among biomaterials, a tri polymeric hydrogel of Collagen type I (Coll), chitosan and hyaluronic acid is a promise for BTE applications. Furthermore, carbonated nanometric hydroxyapatite (nanoCHA) was added to improve the biomechanical properties, forming the hybrid hydrogel. Our goal was to evaluate the influence of hybrid hydrogel in DPSC spheroid cell migration.

Methods and results

DPSCs were isolated from human adult dental pulps (CAAE: 74716523.8.0000.5467) and used at passage 6 to fabricate 100 μm spheroids using an agarose micromould. After compaction, spheroids were embedded in hydrogels and cultivated in clonogenic (CM) or osteogenic media (OM) for 14 days. The experimental groups consisted of pure hydrogel, hybrid hydrogel (nanoCHA+), and two control groups of pure Coll and Coll + nanoCHA. We observed cell migration in all conditions from 24 hours onwards. The presence of nanoCHA is not proving to be determinative, and the OM appeared to exert a more significant influence on cell migration than the CM. We also observed that the spheroid's morphology switches from spherical to ellipsoidal, with an apparent directionality of migration. Histologically, we observed cellular migration and modification in the morphology of the spheroids, similar to those seen during cultivation. Additionally, we noticed a trend of cellular migration towards the surface, which was indeed the region with the highest concentration of spheroids.

Funding agency: FAPESP

Keywords: DPSC; spheroid; hydrogel, carbonated nanometric hydroxyapatite; Bone Tissue Engineering.

BIOFABRICATION OF OSTEOGENIC SPHEROIDS FROM HUMAN DENTAL PULP STEM CELL OF DECIDUOUS TEETH (SHEDs)

C. S. Maas^{1,2*}, F. N. O. Fulfaro¹, H. A. Santos², K. B. S. Paiva¹

¹Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo – Brazil

²Department of Biomedical Engineering, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen – The Netherlands

*E-mail: claramaas@usp.br

Introduction: Various populations of stem cells found in the oral cavity have been characterised and originated from neural crest stem cells and are considered promising for craniofacial tissue regeneration. Among them, stem cells from the dental pulp of deciduous teeth (SHEDs) demonstrate a high capacity for cell differentiation, and their secretome exhibits angiogenic, neurotrophic, and immunomodulatory properties. In addition, the SHEDs are easily obtained non-invasively due to the exfoliative tooth feature. Spheroids are characterised as homogeneous, self-organised cellular aggregates grown in suspension or heterogeneously, often involving the co-culture of multiple cell types to form functional 3D tissue. Stem cell spheroids also possess a high capacity to secrete autocrine and paracrine molecules. Oxygen concentration plays a fundamental role in maintaining stem cell plasticity and proliferation, with hypoxic conditions modulating cell secretomes. Compared to other dental pulp stem cells, the proliferation potential of SHEDs under hypoxic conditions was higher in monolayer cultures. However, spheroids of SHEDs and their secretome have not yet been evaluated under hypoxic conditions. In this study, our goal was the biofabrication of osteogenic spheroids from SHEDs.

Materials and Methods: SHEDs were isolated from dental pulps collected from orthodontic patients for six to seventeen years (Ethical Approval Process Number 28857920.0.0000.5467/ICB-USP). The pulp was separated from a remnant crown and then digested enzymatically (solution of 3 mg/ml collagenase type I and 4 mg/ml dispase) for 1 hour at 37°C. Single-cell suspensions were by passing the cells through a 70-µm strainer^[5]. Primary SHEDs were subcultured in a clonogenic medium (α-MEM + 10% FBS + antibiotics + 50 mM ascorbic acid). SHEDs were used in passage #6 to manufacture small (150-200 µm) spheroids formed in agarose micromolds with 256 circular recesses, creating in each of them a fully compacted spheroid after three days (day 0). Those spheroids were cultivated in clonogenic medium and osteogenic medium (clonogenic medium supplemented with 1 µM dexamethasone + 10 mM β-glycerophosphate) under normoxia (20% O₂) or hypoxia (2% O₂) for 28 days. Morphological (via scanning electron microscopy), ultra-structural (via transmission electron microscopy) and histological analysis were conducted.

Results and Discussion: Over time, the spheroids decreased in diameter through a continuous process of compaction, which is more pronounced when in an osteogenic microenvironment and normoxia. Regarding the cytoarchitecture, up to 7 days, the cells are more homogeneously distributed throughout the spheroid. It

was also possible to observe cell aggregates inside and elongated cells on the surface of the spheroids. Results showed that the spheroid morphology is more compact in osteogenic and hypoxia environments. In addition, SHED spheroids under hypoxia presented a more homogeneous surface morphology. On the inside, it was possible to observe thicker layers composed of flat cells on layers closer to the surface. It was also possible to confirm the presence of more extracellular vesicles and a denser extracellular matrix composition of spheroids in osteogenic medium under hypoxia. Spheroids in osteogenic medium under hypoxia also presented more collagen fibres when compared to the ones under normoxia, as well as early signs of mineralisation sites.

Conclusions: So far, it is possible to conclude that spheroids from SHEDs are viable for a long time of culture and that evident differences are observed depending on the concentration of oxygen in the microenvironment. Also, morphological evidence shows that hypoxia could affect the secretome, and it will be investigated soon.

Financial support: CAPES; Fapesp.

EFFECT OF ACUTE SYMPATHETIC HYPERACTIVITY IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS PROGRESSION

Lopes, G. S., Ramalho, L. S., Krum, B. N., Bechara, L. R. G, Ferreira, J. C. B. Department of Anatomy. Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (ICB-USP).

Background and Aim: Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects 800 million of people in the world. ALS patients display a progressive motor disorder after the onset of the disease, characterized by muscle spasticity, muscle atrophy and respiratory failure. Several studies have suggest that around 50% of patients have non-motor symptoms, indicating that other systems might be related to the pathophysiology of ALS. Autonomic dysfunction is detectable in 75% of ALS patients and experimental models have reported symptoms related to sympathetic hyperactivity, as seen in other disorders such as Parkinson's and Alzheimer's disease, raising the hypothesis that dysfunction in other systems might contribute to the onset and progression of ALS. Thus, the objective is to test the effect of acute sympathetic hyperactivity induced by isoproterenol (a beta adrenergic receptor agonist) in the progression of ALS, using genetically modified male mice that develop ALS as a result of overexpression of the mutant enzyme human SOD1-G93A.

Methodology and Results: We used Wild type and B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J (SOD) male mice, which were treated with vehicle (saline) or isoproterenol by intraperitoneal injection (200mg/kg body weight). This animals were randomized into four groups (n=6 per group): WT+vehicle (WT Veh); WT+isoproterenol (WT Iso); SOD+vehicle (SOD Veh); SOD+isoproterenol (SOD Iso). During the early and end symptomatic states of ALS, we evaluated a series of behavioral and functional analysis, including: grip strength, wire hanging test, rotarod and open field test (CEUA: 1365200922).

The behavioral and functional analysis revealed that SOD Veh and SOD Iso mice presented a significant weight loss from day 130 to day 150 (-15%), a decrease in latency to first fall in the wire hang test from day 80 to day 150 (-50%), a increase of number of falls and a reduced latency to first fall in rotarod test on day 150 (-40%) compered to WT Veh and WT Iso (p=0.04). These alterations were followed by a decrease in grip strength test (-20%), loss in muscle strength (-50%), an increase in immobility time performed in open fiel test (-60%) and a reduction of the stride distance in ambulation test performed by foot-print on day 150 (-20%) compared to WT Veh and WT Iso (p=0.03). When we compared these alterations between WT Veh and WT Iso, and SOD Veh and SOD Iso, there were no difference among the groups.

Conclusion: Collectively, our preliminary findings demonstrate that ALS mice present behavioral and functional features of ALS and the acute sympathetic hyperativity didn't have a significant effect in ALS progression.

Financial support: FAPESP 2022/08635-4

INFLUENCE OF TNF- α ON HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS OSTEOGENIC SPHEROIDS POTENTIAL ON MACROPHAGE MODULATION VIA SECRETOME Silva, G.H.A., Ferreira, D.B., Câmara, N.O.S., Paiva, K.B.S., Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: In Bone Tissue Engineering (BTE), spheroids gained attention for recreating the in vivo microenvironment. Human adult dental pulp stem cells (DPSCs) stand out for their bone differentiation potential and immunomodulation. Macrophages (M Φ) can polarize towards M1/proinflammatory or M2/anti-inflammatory phenotypes. Thus, this project goal was to evaluate the DPSC spheroid secretome influence on M Φ polarization under an osteogenic and Tumour Necrosis Factor (TNF)- α -mediated proinflammatory microenvironment.

Métodos e Resultados: The single 500 μ m spheroid was formed in suspension in basic medium (BM). After 3-days, osteogenic differentiation was induced in osteogenic medium (OM) for 1 and 14-days. Next, spheroids were incubated with 10, 50 or 100 ng/ μ L of TNF- α for 6h, 12h, 24h, 48h or 72h and conditioned media (CM) was carried out in serum-free media for more 2 days. THP-1 lineage derived-M Φ were incubated with the spheroids CM for 2-days. The markers for M1 (IL-1B, TNF-a) or M2 (TGF-B, CD200R) and VEGFA angiogenic gene were evaluated by RT-qPCR analysis. In general, all genes were upregulated on CM-BM cultivated spheroids. Although CM-OM 1-day cultivated spheroids expression profile was similar to CM-BM, 14-days pro-osteogenic spheroids led to gene upregulation only after 6h of TNF- α incubation, except for CD200R and VEGFA, sustaining only M2-like polarization and VEGFA expression after long exposition to TNF- α .

Conclusão: Our data emphasizes the relevance of inquiry about DPSC's Spheroids priming process under different conditions for increased immunomodulatory response and improved BTE applications in vivo.

Proteomic Signature of the Extracellular Matrix in Adrenocortical Neoplasms

Jean Lucas Kremer^{1*}, Henrique Sanchez Ortega^{1*}, Talita Souza-Siqueira³, Claudia Blanes Angeli², Maria Candida B V Fragoso⁴, Leo Kei Iwai⁵, Giuseppe Palmisano^{2,6}, Claudimara Ferini Pacicco Lotfi¹

1. Laboratory of Cellular Structure and Function, Dep. of Anatomy; Institute of Biomedical Science (ICB), University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

2. Glycoproteomics Lab., Dep. of Parasitology, ICB-USP.

3. Laboratory of Cellular, Genetic and Molecular Nephrology, School of Medicine-USP.

4. Adrenal Unit, Laboratory of Hormones and Molecular Genetics LIM/42, Division of Endocrinology and Metabolism, Clinics Hospital, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil.

5. Laboratory of Applied Toxicology, Center of Toxins, Immune-response and Cell Signaling LETA/CeTICS, Butantan Institute, São Paulo, Brazil.

5. School of Natural Science, Macquarie University, Sydney, Australia.

* Contributed equally

The extracellular matrix (ECM) comprises macromolecules that form a complex three-dimensional network, filling the intercellular spaces and maintaining tissue structure and function. The ECM plays a crucial role in regulating essential cellular processes such as, adhesion, differentiation, and cell signaling. In normal adrenal glands of rats and humans composed of a cortex and medulla surrounded by a capsule, the protein composition of this ECM was described by Kremer et al. (2024). The study also explored the impact of the ECM on proliferation and steroidogenesis in the normal and tumor adrenal cortex. This study aims to provide insights into the composition and regulation of the ECM in the human adrenal cortex neoplasm microenvironment. The ECM composition was compared to adult human normal adrenal cortex and adrenocortical neoplasms. We described by proteomic analysis the ECM protein signatures of the human normal adrenal (HNA, n=5) obtained from the USP-Capital Death Verification Service and neoplasm fragments of Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia (PMAH) with (w) ARMC5 mutation (n= 5) and without (wt) mutation (n= 5); Adrenal Cortical Adenoma (ACA, n=8); Adrenal Cortical Carcinoma (ACC, n=8) and Oncocytic Adrenal Carcinoma (OACC, n=7) obtained from the Adrenal Unit, Laboratory of Hormones and Molecular Genetics LIM/42, FMUSP (Ethics Committee nº 6.524.377). The samples without samples decellularization were initially resuspended in lysis buffer (urea 8M), reduced with DTT, alkylated with IAA, digested with trypsin, and desalted by home-made stage tips before the analysis in a Vanquish Neo UHPLC coupled to an Orbitrap Exploris 480 mass

spectrometer. Raw LC-MS/MS files were processed using MaxQuant 2.4.9 software/Andromeda search engine against human databases and Perseus software v2.0.11. Proteins were annotated using UniProtKB and Gene Ontology- AmiGO2 (GO) Protein-protein interaction networks and functional enrichment analysis were performed using the STRING platform. A total of 362 ECM-proteins were qualitatively identified and validated in the Human Matrisome DB 2.0. Of these, 175 were quantitatively analyzed and categorized into 59 glycoproteins, 18 collagens, 54 ECM regulators, 8 proteoglycans, 22 ECM-affiliated proteins, and 14 secreted factors. Statistical comparison between groups showed differentially expressed in various comparisons: 19 proteins in HNA vs. PMAH w; 12 proteins HNA vs. PMAH wt; 15 proteins HNA vs. ACA; 25 proteins HNA vs. ACC; 26 proteins HNA vs. OACC; 9 proteins PMAH w vs. PMAH wt; 26 proteins ACA vs. ACC; 15 proteins ACC vs. OACC. Further validation using complementary approaches will highlight the role of the differentially regulated ECM proteins in adrenocortical neoplasms. Supported by Fapesp grants 2018/18257-1 (GP), 2018/15549-1 (GP), 2020/04923-0 (GP), 2013/07467-1, 2021/04770-1, 2023/11931-7 and 2020/02988-7.

MYOSIN POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS ARE LINKED TO MUSCLE WEAKNESS SEVERITY IN CRITICALLY ILL ICU PATIENTS

Ribeiro, F.^{1,2}, Widgren, A.³, Cacciani, N.², Hedström, Y.², Moriscot, A.S.¹, Bergquist, J.³, Larsson, L.^{2,4}

¹Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

³Department of Chemistry (BMC), Uppsala University, Uppsala, Sweden

⁴Viron Molecular Medicine Institute, Boston, United States

Introduction and Aim: Mechanical ventilation (MV) is a life-saving intervention often used in intensive care units (ICU) to treat critically ill patients. However, prolonged MV and immobilization leads to muscle wasting and weakness in ICU patients. Post-translational modifications (PTMs) of sarcomeric proteins are believed to be an important underlying molecular mechanism. This study investigates the role of myosin heavy chain (MyHC) protein PTMs on muscle weakness following ICU hospitalization. **Methods:** Six ICU patients were included in this study. Muscle biopsies from the tibialis anterior (TA) muscle were collected after the first (D1) and twelfth (D12) days of ICU hospitalization. Muscle structural and functional analyses were conducted at the single-cell level. Isolated MyHC proteins were subjected to liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics (LC-MS/MS) analyses of PTMs. Data are presented as mean \pm standard deviation and statistical significance was accepted as $p < 0.05$. The study was approved by the ethics committee at the Karolinska Hospital (#2016/242-31/2). **Results and Conclusion:** A $\sim 40\%$ decline ($p < 0.05$) in single TA muscle fiber specific force (maximum force normalized to muscle fiber cross-sectional area (CSA)) was observed from the 1st (23.7 ± 5.2 N/cm²) to the 12th day (14.3 ± 6.4 N/cm²) and a 27% decline ($p < 0.05$) in fiber CSA from 2295 ± 235 μm^2 to 1657 ± 354 μm^2 . The larger decline in force than fiber size indicates a dysfunction in the contractile machinery. In half of the examined muscle biopsies from D12, a subpopulation of fibers with similar atrophy levels (2295 ± 235 μm^2 vs. 1465 ± 556 μm^2 , $\sim 35\%$, $p < 0.05$) did not generate any force and these non-force (NF) generating fibers showed reduced specific force from 23.7 ± 5.2 N/cm² to 0.0 ± 0.0 N/cm² ($p < 0.0001$). LC-MS/MS proteomic analyses of these three sub-groups (i.e. ICU_D1, ICU_D12, and ICU_D12_NF) showed similar MyHC isoforms (I, IIa and IIx) distribution with a predominance of the slow-twitch type I MyHC in all groups. The LC-MS/MS analyses of type I MyHC showed 35 PTMs altered between the groups, with a marked increase of PTMs in ICU_D12 compared with ICU_D1, while a dramatic decrease was found uniquely in the ICU_D12_NF group. Four classes of PTMs were found: oxidation (68%), ubiquitination (23%), acetylation (6%), and methylation (3%). Eight PTMs were added into ICU_D12 fibers MyHC motor, near the ATP-binding site, and within the IQ domain compared with ICU_D1. Moreover, three ubiquitinated residues were missing in motor and rod domains. Conversely, ICU_D12_NF contained two oxidations, one in the motor and another in the rod domain, while all other PTMs were missing. These findings suggest that myosin PTMs are an associated underlying mechanism to ICU-acquired muscle weakness in response to long-term immobilization and mechanical ventilation.

Funding: São Paulo Research Foundation (FAPESP) grant no 2022/14495 to FR, ASM and LL.

SET7 PHARMACOLOGICAL INHIBITION REVERSES ISOPROTERENOL-INDUCED CARDIAC REMODELING AND ATTENUATES HEART DYSFUNCTION

Lunardon, G. (1), Silva, T.O. (1), Sougey, W.W.D. (1), Silva 2, A.A. (2), Irigoyen, M.C.C. (2), Barreto-Chaves, M.L.M. (1), Wang, D.Z. (3), Diniz, G.P. (1,3)

(1) Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

(2) Department of Cardiopneumology, Heart Institute, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

(3) Center for Regenerative Medicine, USF Health Heart Institute, University of South Florida, Tampa, FL, USA

Abstract

Background and aims: Set7 is a methyltransferase that regulates the expression of several genes through the methylation of histones and modulates the activity of non-histone proteins. Recently, we demonstrated that Set7 deletion attenuates isoproterenol-induced cardiac fibrosis and delays heart dysfunction. However, whether the pharmacological inhibition of Set7 exerts beneficial effects to counteract isoproterenol-induced cardiac disorders is unknown. The aim of this study is to investigate the effect of a Set7 pharmacological inhibitor (sinefungin) in cardiac remodeling and dysfunction induced by isoproterenol. **Methods and results:** Eight-week-old male C56BL/6 mice were injected subcutaneously with vehicle (Veh, saline), isoproterenol (Iso, 40 mg/kg/day) for 14 days, or isoproterenol for 7 days followed by combined treatment with isoproterenol and sinefungin (10 mg/kg/day) for additional 7 days (Iso+Sine) (CEUA ICB/USP 9344271022). Our data revealed that Iso mice exhibited higher heart weight/tibia length ratio (HW/TL), cardiomyocyte area and myocardial fibrosis compared to Veh mice, indicating development of cardiac remodeling. Notably, the sinefungin injection in Iso+Sine mice reversed the increased HW/TL ratio, cardiomyocyte area and myocardial fibrosis compared to Iso mice. Echocardiography showed that Iso mice had reduced ejection fraction and fractional shortening compared to Veh mice, indicating systolic dysfunction. Interestingly, the Iso+Sine mice displayed a trend of increase in ejection fraction and fractional shortening compared to Iso mice. Moreover, the Iso and Iso+Sine mice exhibited a higher IVRT compared to Veh mice, indicating diastolic dysfunction. In addition, the Iso mice had an increase in E/e' ratio compared to Veh mice. Conversely, the Iso+Sine mice displayed a E/e' ratio similar to Veh mice. **Conclusion:** Collectively, our data suggest that Set7 pharmacological inhibition reverses isoproterenol-induced cardiac hypertrophy, fibrosis, and attenuates systolic dysfunction. Further experiments are required to corroborate these findings and to determine by which mechanisms sinefungin influences cardiac remodeling and dysfunction in response to isoproterenol.

Key words: cardiac remodeling, Set7, cardiac dysfunction, isoproterenol.

Funding: FAPESP 2022/10060-0; 2020/13211-3

Introdução e Objetivos: As disciplinas de Anatomia envolvem tradicionalmente conteúdo teórico e prático ministrado em aulas expositivas seguidas de aulas práticas em laboratório envolvendo o uso de cadáveres e peças anatômicas. Entretanto, ainda que as aulas práticas promovam um momento de aprendizado construtivo utilizando a visualização de estruturas reais, é evidente que o ensino teórico precisa ser modernizado a fim de promover o engajamento dos alunos e melhorar o processo de retenção a longo prazo do conhecimento. Para tanto, o presente projeto visa a produção de jogos online interativos (*quiz*) na plataforma *Quizizz* com os temas das aulas de Anatomia Humana em nível de Graduação, e a avaliação da opinião dos docentes e alunos sobre a eficiência desta metodologia ativa em promover a interatividade da aula, participação e motivação dos alunos e sua percepção sobre a influência do jogo no aprendizado.

Métodos e Resultados: Para cada sistema anatômico ministrado na Graduação foram estabelecidos os objetivos de aprendizagem e as dúvidas mais comuns dos alunos, considerando uma Disciplina de Anatomia Geral com carga horária de 60 a 90 horas. Para cada sistema, foram elaborados *quizes* (doze *quizes* de dez perguntas) no *Quizizz*, baseado no conteúdo mínimo esperado de aprendizagem e nas dúvidas mais comuns dos alunos. Os *links* para os jogos foram amplamente divulgados juntamente com material de apoio ao docente. A pesquisa de opinião foi feita através da plataforma *Google Forms* usando respostas em escala *Likert* para posterior análise dos dados. Até o momento, a pesquisa foi respondida por 47 alunos e 2 docentes e, portanto, serão aqui descritos apenas os resultados relativos aos alunos. A maior parte dos alunos considera que a ferramenta foi eficiente ou muito eficiente em aumentar a participação ativa na aula (100%), melhorar o aprendizado (97,2%), auxiliar a esclarecer dúvidas (87,2%) aumentar a motivação (85,1%), aumentar o interesse (85,1%) e manter a atenção (82,9%). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (CAAE 78749324.0.0000.5467).

Conclusão: Os resultados obtidos mostram que os alunos participantes observaram benefícios da gamificação do ensino de Anatomia Humana sobre seu engajamento e motivação em sala de aula que se refletem positivamente sobre seu aprendizado.

Apoio Financeiro: Programa Unificado de Bolsas (Edital 2022/2023 e 2023/2024).

BIOFABRICATION OF OSTEOGENIC SPHEROIDS FROM HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS FOR BONE TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS. Ribeiro, I.P.B, Ferreira, D.B., Frazão, R.S., Granjeiro, J.M., Paiva, K.B.S, Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences-USP

Introduction and Goals: Dental pulp stem cell spheroids (DPSCs) have been studied for their potential in Bone Tissue Engineering (BTE). The aim of this study is biofabricate osteogenic DPSC spheroids with different diameters and characterize the cytoarchitecture, morphology, ultrastructure and gene expression related to osteogenic differentiation and extracellular matrix proteins (ECM).

Methodology and Results: DPSCs were isolated from human adult dental pulps (CAAE: 2885719.1.0000.5467 and CAAE: 28857519.1.3001.0076) and used to fabricate spheroids with 100, 500 and 1000 μm of diameter. Spheroids were cultivated in basic medium (BM) or osteogenic medium (OM) under normoxia (20% O_2) or hypoxia (2% O_2) for 28 days. They were analyzed through scanning and transmission electron microscopy, hematoxylin and eosin staining and RT-qPCR. The compaction kinetics occurred with rapid reduction in diameter in the first days of culture, which stabilizes around day 14. The morphology of spheroids was similar within experimental groups, being OM inducing greater cellular organization and cohesion. The cytoarchitecture of the spheroids revealed a decrease in cell viability dependent on the culture time, mainly in the central regions. Spheroids in OM showed the formation of globular structures like mineralization nodules and visible abundance of ECM. The surface cells are elongated under all experimental conditions. High RUNX2 upregulation was seen in both osteogenic induced groups. Coll I expression was upregulated from 21 to 28 days in OM and normoxia. Interestingly, SDF-1 showed prominent upregulation in OM and normoxia through 7 to 28-days in culture.

Conclusion: Culture time, medium, and oxygen tension interfere with the compaction kinetics, morphology, cytoarchitecture and ultrastructure of spheroid with different sizes. 500 μm spheroids can differentiate in osteoblast-like cells and form an enriched-ECM.

Financial support: FAPESP.

DIABETES IS ASSOCIATED TO THE REDUCTION OF CAROTID BODY VOLUME IN RESISTANT HYPERTENSIVE PATIENTS

Lamoel Mohandas Cruz da Silva¹, Camilla Giovanna Vieira de Morais¹, Kevin Rafael de Paula Morales², Carlos Eduardo Rochitte², Silvia Lacchini¹

1 - Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo – ICB USP; 2 – Heart Institute of the Hospital das Clínicas of the Faculty of Medicine of the University of São Paulo – InCor HC FMUSP.

Background and Objective: Considering that carotid bodies (CB) are involved in the counterregulatory response to hypoglycemia and that their impact on blood pressure control still needs to be better clarified, the objective of this study was to characterize the volumetric reduction of CB in controlled and uncontrolled hypertensive patients.

Methods: CT angiograms of hypertensive patients treated at the Heart Institute (University of São Paulo Medical School) were studied. The evaluated patients were separated into four groups: hypertensive (receiving 1 to 2 categories of antihypertensives) controlled (H-C, n=42) and uncontrolled (H-U, n=23), and resistant hypertensives (receiving 3 or more categories of antihypertensives) with controlled (HR-C, n=17) and uncontrolled (HR-U, n=23) blood pressure. CT angiograms (Aquilion ONE/PRISM–Canon) of the cervical arteries with iodinated contrast were evaluated. Artery reconstructions used 0.5mm thick sections, with orthogonal measurements of CB to evaluate bilateral carotid diameters and bifurcations.

Results: The morphology of common, internal and external carotid arteries was very similar between the groups. The mean age between groups was not significantly different (H-C: 67±12; H-U: 63±16; HR-C:65±9; HR-U: 67±13 years). When evaluating the presence of atherosclerotic lesions, a similar proportion, approximately 50%, was found in all groups. On the other hand, the presence of diabetes in HR-U group was 52%, while in other groups it was 30%. Furthermore, CB volume (mm³) in the presence of diabetes, presented an important reduction, especially in resistant hypertensive patients (H-C: -4%; H-U: -27%; HR-C:-55%; HR-U: -64%).

Conclusions: The reduction of CB volume may be associated with the loss of microvascularization, mediating a possible hyperactivity of CB, which consequently maintain the comorbidities observed in these patients. Experimental studies showed that bilateral resection of the carotid sinus nerve completely prevents insulin resistance and hypertension, reinforcing the strong effect of diabetes upon CB normal function found in the present study. Longitudinal studies will contribute to a better understanding of CB regulation and the impact of diabetic state on blood pressure control.

Funding

Programa Unificado de Bolsas de Estudos da Universidade de São Paulo – PUB USP e FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

GROWTH HORMONE SECRETION DISRUPTION LEADS TO SEX DIMORPHIC EFFECTS ON MICES'S REPRODUCTION

Guilherme Andrade Alves¹, Henrique Rodrigues Vieira¹, Renata Frazão¹

¹Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

Introduction and Goal: During puberty, growth hormone (GH) is known to modulate the expression of genes required for reproduction, such as the *Kiss1* and *Gnrh1*. Kisspeptins, the product of the *Kiss1* gene, is considered the main modulators of the Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron's activity. Kisspeptin neurons are located in the anteroventral periventricular nucleus/periventricular nucleus (AVPV/PeN) and the arcuate of the hypothalamus (ARH), hypothalamic regions that have already been described as GH responsive. However, it is unknown whether changes in GH secretion/signaling during development impair puberty or fertility. Our goal was to evaluate if GH hypersecretion or deficiency modulates the reproduction of male and female mice due to the impairment of kisspeptin neurons.

Methods and Results: [CEUA N°7681180521](#). Male and female mice that hypersecrete GH (here denominate as bGH) or with spontaneous GH deficiency (*Ghrhr^{lit/lit}*), as well as, their littermates (control) were evaluated. Mice's body weight gain and sexual maturation were determined during development. The body length, fat and lean mass, estrous cycle, fertility, testis morphology, hypothalamic mRNA expressions and frequency and amplitude of inhibitory postsynaptic potentials (sIPSC) of kisspeptin neurons were determined at the adult stage. Unpaired Student's t-test and Two-way ANOVA were used. As predicted due to GH secretion, both male and female bGH mice showed increased body weight gain during development and differences in nasoanal length only in males; whereas *Ghrhr^{lit/lit}* male and female mice showed decreased body weight gain and lower nasoanal length, both compared to control mice. bGH mice demonstrate to have smaller lean mass index in both sexes, whereas only females showed higher fat mass index compared to control mice. bGH and *Ghrhr^{lit/lit}* female mice showed similar puberty timing compared to control mice, but bGH and *Ghrhr^{lit/lit}* male mice demonstrate late puberty onset. Only *Ghrhr^{lit/lit}* females demonstrate higher levels of hypothalamic *Tac3* and *Ghrh* mRNA expression. There were no differences in ovary and testis weight in both mice models. Interestingly, *Ghrhr^{lit/lit}* male mice were subfertile and bGH female mice were infertile, whereas bGH male mice and *Ghrhr^{lit/lit}* female mice are fertile.

Conclusion: Our results suggest that GH hypersecretion impairs fertility in female mice, but does not influence puberty. However, whether infertility observed in bGH female mice is peripheral system-related and, whether hypothalamic kisspeptin neurons' electric activity is compromised due to GH secretion, needs to be further determined.

Financial support: FAPESP, CNPq, CAPES.

Effect of corticosterone on melanin-concentrating hormone producing-neurons in the medial preoptic area during lactation in Long-Evans rats (*Rattus norvegicus*)

Helou, A.Y.¹, Bittencourt, J.C.^{1,2}

Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences-USP

1 Laboratory of Chemical Neuroanatomy; 2 Center for Neuroscience and Behavior, Institute of Psychology, University of Sao Paulo, Sao Paulo – SP, Brazil

Melanin-concentrating hormone (MCH) is found in lactating mammals' medial preoptic area (MPOA), peaking at the end of the lactation period. During this period, the effects of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis are suppressed to allow normal maternal behavior. Nevertheless, corticosterone (CORT) can reduce neurogenesis when excessively released. However, the effects on the neurons producing MCH, specifically in the MPOA, have not been widely explored. With the hypothesis that neuroplasticity or neurogenesis may occur in MCH neurons in this region, we intend to study the effects of the chronic application of Dexamethasone (DEX, a potent glucocorticoid) and Metyrapone (MET, a CORT production inhibitor) in lactating rats to observe possible phenomena related to variations in CORT, adrenocorticotropin (ACTH), and MCH levels during this period. We will use 136 Long-Evans lineage females, divided into four groups: Control – (no manipulation); Control + (0.9% saline); DEX; and MET. The collection of brains, blood, and adrenals will be performed on postpartum days (PPD) 2, PPD5, PPD12, and PPD19. Blood was collected from 4 primiparous females on PPD1 and 4 females in diestrus to compare groups. We quantified maternal behavior, tracked the primiparous females' weight and food and water intake, and analyzed plasma levels of the hormones ACTH, CORT, and MCH. The adrenals collected after euthanasia and perfusion were weighed, the brains were sectioned, and immunohistochemistry was performed for counting of MCH-immunoreactive (ir) neurons in the MPOA, and double labeling for MCH and galanin, as well as MCH and EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine; a marker for newborn neurons). In a pilot study, we observed subtle changes in serum CORT levels between the unilateral adrenalectomy (ADX) and *sham* groups and a slight increase in the number of MCH-ir neurons in the PPD19 groups in the MPOA after unilateral ADX, compared to their respective control, although not significant. DEX and MET altered the patterns of maternal behavior and ACTH and CORT levels, but we found no differences in the number of MCH-ir neurons in the MPOA of groups. So far, our results concerning the double labeling of MCH- and EdU-ir were unsatisfactory. Double labeling of MCH and galanin is still being quantified. The study aims to better understand possible neurogenesis/neuroplasticity in the hypothalamus during lactation, considering the presence of MCH-ir neurons in the MPOA and their relationship with CORT in primiparous rats. The results so far reinforce the need for more in-depth studies on the role of MCH and its relationship with stress response and maternal behavior.

Keywords: hypothalamus, neuropeptides, melanin-concentrating hormone, neurogenesis, neuroplasticity, dexamethasone, metyrapone

Funding:

FAPESP, São Paulo Research Foundation; Grant # 2016/02224–1

CNPq, Grant # 404806/2021–0.

We are thankful for the support provided by the Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES.

AVALIAÇÃO DA LINHAGEM CELULAR AC16 COMO MODELO PARA ESTUDAR HIPERTROFIA CARDIOMIOCÍTICA.

Olher-Gomes, E. Cerri, G. C., Sougey, WWD., Barreto-Chaves, MLM. Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

Introdução e Objetivos

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, sendo a hipertrofia cardíaca (HC) uma condição intermediária comum à maioria delas. A HC é caracterizada por um ganho de massa cardíaca que ocorre em resposta ao aumento da demanda funcional do coração, levando à adição de sarcômeros nos cardiomiócitos (CMs). De forma crônica, a persistência dos estímulos pode levar a um fenótipo de HC descompensada, caracterizada pela morte de CMs, fibrose e disfunção cardíaca. Para permitir estudos *in vitro* mais próximos do fenótipo de CMs do tecido cardíaco de humanos, a linhagem celular AC16 foi desenvolvida a partir da fusão de culturas primárias não-proliferativas de tecido ventricular humano adulto com uma linhagem modificada de fibroblastos de pele humana. Porém, o uso das células AC16 para estudo da HC ainda precisa ser padronizado em nosso laboratório. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a linhagem celular AC16 em relação ao ciclo de crescimento celular, morfologia e assinatura molecular.

Métodos e Resultados

As células da linhagem AC16 foram descongeladas e cultivadas em meio de proliferação (DMEM-F12 + 12,5% *fetal bovine serum* + 1,5% penicilina e estreptomicina (PS)) ou diferenciação (DMEM-F12 + 12,5% *horse serum* + 1,5% PS). O número de células foi contabilizado na câmara de Neubauer nos tempos de 24h, 48h, 72h e 96h de cultivo. Qualitativamente, observamos que tanto as células diferenciadas quanto indiferenciadas apresentaram fenótipo alongado com núcleo oval, sem capacidade de contração. Até às 72h de cultivo no meio de proliferação, a proliferação celular se encontra na fase log, e após esse período houve uma diminuição no número de células. No meio de diferenciação, o número de células se estabilizou após 48h de cultivo, sugerindo a fase lag.

A análise da expressão gênica por RT-qPCR evidenciou que as células AC16 expressam genes típicos de cardiomiócitos como troponina, tropomiosina, Myh6 e Myh7, GATA4 e NKX2.5, com valores ainda mais elevados após 48h de cultivo em meio de diferenciação. Já a expressão de genes característicos de fibroblastos como periostina e vimentina foram baixos e diminuíram ainda mais após 48h de diferenciação. Além disso, por imunocitoquímica, confirmamos a expressão proteica de tropomiosina nas células AC16 diferenciadas por 48h.

Conclusões

Nossas análises moleculares indicam que as células da linhagem AC16, quando diferenciadas, demonstram forte potencial para serem utilizadas em experimentos que utilizam cardiomiócitos, como por exemplo para estudos de hipertrofia cardiomiocítica.

Apoio Financeiro

Este projeto é financiado pela FAPESP (Processo n.:2023/08673-6)

ANALYSIS OF THE INFLUENCE OF CARBONATED NANOMETRIC HYDROXYAPATITE ON THE FORMATION OF HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS SPHEROIDS

R.S., Frazão¹, A.M., Rossi², J.M., Granjeiro³, I.P.B., Ribeiro¹, K.B.S., Paiva¹

1. Biology Laboratory of the Extracellular Matrix and Cellular Interactions (LabMec), Department of Anatomy, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo (USP), São Paulo/SP, Brazil
2. Brazilian Center for Physics Research (CBPF), Rio de Janeiro/RJ, Brazil
3. National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO), Duque de Caxias/RJ, Brazil.

Introduction and Objectives: Dental pulp stem cells (DPSCs) have been cultured as spheroids to develop personalised bone grafts. Hydroxyapatite is the main mineral in bone tissue, but it has low biodegradation rates. Carbonated nanometric hydroxyapatite (nanoCHA) was developed to increase the therapeutic capacity, which has bioactive properties such as biocompatibility and cytocompatibility. We aimed to evaluate the influence of nanoCHA on the DPSC spheroid formation under scanning and transmission electron microscopy. **Methods and Results:** DPSCs were isolated from human adult dental pulps (CAAE: 67970523.6.0000.5467) and used at passage 6 to fabricate 100 µm spheroids using an agarose micro mold. nanoCHA at 0.1, 1.0 or 10 µg/mL was added to the serum-free medium and incubated with disaggregated cells for spheroid formation. Spheroids were cultivated in basic (BM) or osteogenic media (OM) for 28 days under normoxia (20% O₂) or hypoxia (2% O₂). We found that the compaction profile of the spheroids in the experimental groups was similar to the control (nanoCHA-). Still, the spheroids in BM and hypoxia had a larger average diameter than in OM and normoxia. SEM showed that the spheroids had a rounded morphology, and the amount of nanoCHA observed on the spheroid surface was proportional to the increase in concentration. TEM showed nanoCHA particles inside the spheroids, with an average size of 10.45 nm for hypoxia and 6.35 nm for normoxia. That size decreased as the concentration of the nanoCHA decreased. **Conclusion:** In conclusion, the presence of nanoCHA did not disturb DPSC spheroid formation.

Financial support: FAPESP

CONTRIBUTION OF ALDA-1, ACTIVATOR OF ENZYME ALDEHYDE DEHYDROGENASE 2, IN THE PROGRESSION OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS IN SOD1*G93A MICE.

Bárbara N. Krum, Luana P. da Silva, Luiz R. G. Bechara, Isabela V. Boas, Lisley S. Ramalho, Julio C. B. Ferreira, Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences – USP.

Introduction and objectives

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease in which reactive aldehydes, 4-HNE in special, have a critical role. The enzyme aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) is associated with eliminating these reactive aldehydes. Therefore, the objective of this research is to investigate the role of ALDH2 on ALS progression by testing a selective ALDH2 activator (AD6626).

Method and results

Wild type and SOD1*G93A mice were treated with either vehicle (VEH - water) or 40 mg/kg of AD6626– n=8-10 per group. Behavioral tests such as Wire hang and Open Field were performed. When comparing SOD1*G93A -VEH X SOD1*G93A -AD6626, ANOVA showed that animals treated with AD6626 stayed longer on Wire hang ($F(33, 252) = 4.371$) and less immobile on Open field ($F(3, 31) = 10.96$). After those tests, the animals were euthanized and its muscles were weighed. Independent of their treatment, there was a decrease in Tibialis anterior (TA) ($F(3, 29) = 55.20$), plantaris ($F(3, 29) = 13.47$; $F(3, 252) = 45.54$) and gastrocnemius ($F(3, 29) = 31.23$) mass in ALS mice when compared to WT mice. We also examined ALDH2 activity and found a decrease in soleus muscle of SOD1*G93A -VEH mice compared to WT-VEH mice. The compound prevented this decrease ($F(3, 28) = 5.474$). Also, we performed the skeletal muscle contractility *ex vivo*. SOD1*G93A -VEH mice showed a decrease at maximum specific force in soleus ($F(3, 21) = 20.0$) and in EDL muscles ($F(3, 21) = 20.03$). We also carried out histological analysis and evaluated neuromuscular junctions (NMJs), in which an increase of fibrosis in TA muscle in SOD1*G93A -VEH mice when compared to WT mice was noticed; AD6626 was able to prevent that effect in ALS mice ($F(3, 12) = 10.24$), and we found no difference in the section area of TA among the groups. Lastly, a decrease in AChR perimeter of the NMJs in SOD1*G93A -VEH mice when compared to all other groups ($F(3, 189) = 5.016$) was found.

Conclusion

Our findings suggest that compound AD6626 seems to contribute to the improvement of some behavioral, biochemical, and histological parameters in ALS, without showing any compromises in healthy wildtype mice.

Funding: FAPESP 2021/10692-3 Number of the ethic committee (Comissão de ética do uso de animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Unversidade de São Paulo): 3870190721

ANALYSIS OF THE MULTI-DIFFERENTIATION INDUCTION POTENTIAL OF PRO-OSTEOGENIC HUMAN DENTAL PULP STEM CELL SPHEROID'S SECRETOME

Ferreira DB, Ribeiro IPB, Granjeiro JM, Paiva KBS - Department of anatomy Institute of Biomedical Sciences-USP

Introduction: It is known that the cell culture models and oxygen tension may modulate the secretome. **Objectives:** The objective was evaluate the monolayer/spheroid, spheroid size and oxygen tension on DPSCs secretome when cultured under osteogenic medium. **Methods:** DPSCs were isolated from human adult dental pulps and used at passage 6 to fabricate 500 μm and 1,000 μm spheroids and monolayers. The spheroids/monolayers were cultured for 14 days in an Osteogenic medium/OM (generators) under normoxia (20% O_2) or hypoxia (2% O_2). Conditioned medium (CM) was produced by fresh serum-free medium for four days, generating basic CM (bnCM or bhCM) or osteogenic CM (onCM or ohCM). Spheroid CM was incubated on undifferentiated monolayers and the CM of the monolayers on spheroids (undifferentiated) for four days (receptors). We analysed the gene expression related to differentiation (osteogenic, endothelial and adipogenic), hypoxia and cytoskeleton. **Results:** For monolayers that received 1,000 μm /onCM, there was a more significant upregulation of β -actin/HIF-1 α genes when compared to controls. In monolayers that received 500 μm /onCM, there were substantial variation only in β -actin, where the group that received bnCM had a decrease, or bhCM had upregulation. In 500 μm and 1,000 μm spheroids induced by monolayer, most differentiation markers had reduced expressions. **Conclusions:** It shows that the increase in multidifferentiation is linked to the 3D conformation/spheroid size/osteogenic stimulus, the larger size being more prone to multidifferentiation monolayers.

FAPESP financial support

AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE FOS APÓS A ATIVAÇÃO DE NEURÔNIOS GLUTAMATÉRGICOS DO NÚCLEO CUNEIFORME

Takeda, A. F. A., Ikebara, J.M., Corrêa, B.R., Canteras, N.S.

Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introdução e Objetivos

O núcleo cuneiforme (CUN) é uma estrutura do mesencéfalo localizada lateralmente à parte caudal da substância cinzenta periaquedutal. Estudos hodológicos mostram que o CUN faz parte do sistema neural que integra as respostas de defesa anti-predatórias, com informações processadas pelo circuito defensivo hipotalâmico e informações visuais superiores, nociceptivas e auditivas. O CUN apresenta corpos celulares glutamatérgicos e gabaérgicos, estudos preliminares de nosso laboratório demonstram que existem projeções diferenciais desses grupamentos celulares do CUN. O trabalho tem por objetivo avaliar a distribuição de FOS, proteína que marca ativação neuronal, ao longo do encéfalo após a ativação optogenética dos neurônios glutamatérgicos do CUN.

Métodos e Resultados

No estudo foram utilizados camundongos adultos, VGlut2-IRES-Cre (Vglut) , (Ceua 8879130522). No projeto foram realizadas cirurgias estereotáxica para injeção do vetor viral para a expressão de ChR2 (AAV-DIO-ChR2-EYFP) para experimentos de ativação optogenética. Nos experimentos de optogenética, foi utilizado um laser azul (473 nm) nas potências de 3-10 mW e frequência de 20Hz. A estimulação foi realizada em uma arena quadrada de campo aberto por 10 minutos com épocas de estimulação alternada de 1 minuto. Para análise de marcação de FOS, foi realizada a estimulação optogenética e 90 minutos depois, o animal foi perfundido e o tecido coletado e processado para a realização de imunohistoquímica.

Os tecidos foram coletados e montados e observou-se qualitativamente intensa marcação de FOS nas regiões: no septo lateral (LS), na amígdala, no tálamo, no hipotálamo e diversas regiões do tronco encefálico. Há uma fraca marcação na região dorsal da matéria cinzenta periaquedutal, um dos principais alvos do CUN, e uma marcação proeminente no setor gabaérgico do núcleo dorsal da rafe(DR).

A estimulação optogenética do CUN evoca respostas de defesa típicas, como congelamento e escape, que dependem do nível de estimulação do núcleo. Quanto ao padrão de ativação analisado com a distribuição da marcação da proteína FOS, tivemos no hipotálamo uma marcação diferenciada nos elementos que compõem o circuito de defesa hipotalâmico. No tronco,

chamamos atenção para marcação na região peripeduncular e no locus corúleos, uma região que é ativada quando o animal é exposto a confrontos com outros animais agressivos.

Conclusões

A estimulação de neurônios glutamatérgicos do núcleo cuneiforme promove diversos comportamentos defensivos. Além disso, há marcação de FOS, após a estimulação, de diversas áreas que são ativas durante o contexto anti-predatório, reforçando que o núcleo cuneiforme faz parte de uma rede complexa do comportamento defensivo.

Este projeto foi financiado pela CNPq.

ABORDAGEM DE MACHINE LEARNING NA QUANTIFICAÇÃO DE LIPOFUSCINA CARDÍACA HUMANA

Rodella, G.H.R.¹, Takano, A.P.¹, Cruz, M.C.², Saldiva, P.H.N.³.

¹Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo;

²Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP-USP), Universidade de São Paulo;

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

Introdução e Objetivos

O envelhecimento celular leva a defeitos na degradação de proteínas danificadas pelo mal funcionamento de proteases, levando ao acúmulo de agregados reticulados chamados de lipofuscina. A lipofuscina, visualizada como pigmentos amarelo-castanhos em lâminas histológicas, é um importante biomarcador de envelhecimento em células pós-mitóticas como cardiomiócitos. Como este pigmento é autofluorescente, frequentemente é analisado em microscópio confocal, e sua quantificação é feita em programas computadorizados de análise de imagem, como o ImageJ. Em paralelo, Machine Learning é um método de quantificação computadorizado baseado no aprendizado de máquina e sua habilidade de reconhecer padrões, possibilitando a quantificação de um grande número de imagens e dados. Desse modo, esse trabalho pretende investigar as possíveis vantagens de utilizar Inteligência Artificial para quantificar a lipofuscina em cardiomiócitos, promovendo uma análise rápida, eficiente e de baixo custo para avaliação do envelhecimento celular.

Métodos e Resultados

Para comparação dos métodos, foram utilizadas cinco lâminas de miocárdio humano previamente coradas com HE. Foram capturadas 5 imagens de cada amostra no microscópio confocal Zeiss LSM 800, em aumento de 20x, sendo obtidas imagens em fluorescência e também em campo claro. As imagens fluorescentes foram quantificadas com uso do software ImageJ, que reconhece a diferença de tonalidade dentro da imagem e, manualmente, faz-se o ajuste para identificar a lipofuscina e o tecido muscular, calculando a proporção lipofuscina/músculo. Para o método de Machine Learning proposto, as imagens tanto fluorescentes quanto em HE foram analisadas com a utilização de dois aplicativos: Ilastik, responsável pelo reconhecimento das áreas de lipofuscina e músculo; e CellProfiler,

programa que trabalha em conjunto com o anterior e permite a quantificação das regiões para cálculo da proporção lipofuscina/músculo. As imagens quantificadas pela máquina foram verificadas pelo examinador. Ao comparar os resultados por meio da análise de variância (One-Way ANOVA), no programa GraphPad Prism 9, verificou-se que não há diferença significativa nas quantificações realizadas pelos diferentes métodos ($P=0,58$).

Conclusão

A Inteligência Artificial surge como um meio de otimizar o trabalho manual. Por meio do machine learning, pode-se quantificar os pigmentos de lipofuscina de maneira muito mais rápida, prática e com a grande vantagem de possibilitar a leitura em lâminas coradas com HE. Assim, esse estudo propõe uma metodologia eficiente e acessível para a quantificação da lipofuscina, visando a potencialização dos estudos envolvendo o envelhecimento celular no tecido cardíaco.

Apoio Financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

THE POMC+ NEURONS OF THE TUBERAL NUCLEUS: ARE THEY ACTIVATED DURING FEMALE SEXUAL BEHAVIOUR?

Zerbini, C; Motta, S. C. – Anatomy Department, Biomedical Science Institute of University of São Paulo (ICB USP)

INTRODUCTION

Sexual Behavior is one of the motivated behaviors controlled by the hypothalamus and plays an important role to the survival of the species and social life of the individuals. Complex as it is, different encephalic nuclei are important for its exhibition, with different circuits controlling male and female conspecific behaviors. Investigating gene expression of the tuberal hypothalamus in rats, we saw that the concentration of pre-opsinmelanocortin (POMC) mRNA in neurons of the tuberal hypothalamic nucleus (nTU) differs according to the hormonal status of the female, being more expressed during the Estrous phase, when the female tends to be more sexually receptive. Furthermore, testing the functional role of this gene in our behavior of interest, we locally knocked-out the POMC gene from nTU cells and observed a significant reduction in mounting behavior during the sexual encounter, indicating the role of these cells in female sexual behavior.

AIM

The aim of the work was to identify if the previously seen functional contribution of the POMC+ nTU neurons are related to the electrical activation of these cells and to characterize them anatomically.

METHODS

To quantify the activation of POMC+ nTU neurons, we used POMC-L10 female mice (2-4 months old), expressing endogenous GFP associated with the POMC promoter. Vaginal smears were collected and analyzed and, once in Early-Estrous, the female was exposed to a sexual-experienced conspecific male. The encounter was interrupted by the ejaculation of the conspecific and, after 90 minutes, the female was transcardially perfused with 100ml 4% PFA, and the brain tissue were sliced in 30 μ m. Fos protein was labelled using immunofluorescence (anti-fos Ac': 1:20000, Alexa 594 anti-rabbit: 1:1000) and counting were done using ImageJ Software, considering 3 different antero-posterior levels of the nTU. Data were tested for homogeneity and normality and compared by One-Way ANOVA or Kruskal-Wallis Test ($\alpha = 0,05$), followed by Tukey or DSCF pairwise comparison. The statistical analysis and graphics were obtained using Jamovi Software and GraphPad Prims, respectively.

RESULTS

Fos and POMC expression were stronger in Caudal levels of the nTU, compared to anterior levels (Fos: $p = 0,009$; POMC: $p = 0,032$), with no significant difference

observed in medium and caudal levels (Fos: $p = 0,118$; POMC: $p = 0,258$). POMC+Fos+ neurons were also observed in more density in medium-posterior levels ($p = 0,024$). Considering proportions, only 19,31% of total Fos+ cells of nTU were also POMC+, compared to 63,76% and 54% in medium and posterior levels of nTU, respectively. Furthermore, considering only POMC+ neurons, 10,42% were activated in the anterior levels of tuberal nucleus, while 32,92% and 32,94% expressed Fos in medium and caudal levels.

DISCUSSION

Considering the obtained data, we can consider that the POMC+ neurons of the tuberal nucleus participating of the sexual behaviour of female mice are distributed medially in more medium-caudal levels of the nTU, even though caudal levels expressed more POMC+ cells compared to other antero-posterior divisions of the nucleus. Also, most of activated neurons of nTU during sexual behaviour are POMC+ in medium-caudal levels, but the proportion of activation of POMC+ neurons indicate that these cells might present subdivisions, once only 1/3 of them are participating of the studied behaviour.

INVESTIGAÇÃO HODOLÓGICA DO CIRCUITO ENTRE O NÚCLEO MEDIAL DA AMÍGDALA E A PARTE VENTROLATERAL DO NÚCLEO VENTROMEDIAL DO HIPOTÁLAMO VIA NÚCLEO INTERSTICIAL DA ESTRIA TERMINAL PRINCIPAL: UM ESTUDO COM TRIO.

Ruivo, P.V., Motta, S.C., Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos

Os comportamentos sociais são essenciais para a sobrevivência dos animais e são regidos por circuitos neurais bem estabelecidos desde o nascimento. Sabe-se que o hipotálamo tem um importante papel na expressão de comportamentos, como os de defesa social, organizando uma resposta a diferentes estímulos através de circuitos específicos. O núcleo medial da amígdala (MeA) e a parte principal do núcleo intersticial da estria terminal (BSTpr) são outras duas regiões que atuam na expressão do comportamento de defesa social e que se projetam para o hipotálamo, especialmente para a parte ventrolateral do núcleo ventromedial do hipotálamo (VMHvl). Além disso, a literatura indica que há uma densa inervação do MeA no BSTpr e que esta última região faz parte de um circuito desinibitório entre MeA e o VMHvl. Portanto, o objetivo do presente projeto foi avaliar a existência de um circuito entre MeA, BSTpr e VMHvl através do método de traçamento de aferências e eferências TRIO, elucidando o conhecimento sobre circuitos neuroanatômicos envolvidos na derrota social.

Métodos e Resultados

O método de traçamento TRIO utilizado envolve injeções de diferentes vetores virais. Em um primeiro momento, foi injetado no VMHvl um vírus retrógrado que expressa a proteína Cre recombinase. Na mesma cirurgia, vetores virais anterógrados e cre-dependentes, os *helpers*, que expressam a glicoproteína de vírus da pseudorraiva, o receptor TVA e a proteína GFP, foram injetados no BSTpr. Após 4 semanas, uma injeção de vírus retrógrado da raiva encapsulado com proteína agonista de TVA foi realizada na mesma coordenada antes usada para o BSTpr. Esse vetor viral apresenta o gene para glicoproteína deletado e expressa a proteína td-Tomato. Logo, esse vírus é *helper*-dependente, garantindo que apenas neurônios que expressam cre recombinase no BSTpr sejam infectados. Após as cirurgias e respeitando o tempo de expressão viral, os animais foram perfundidos e os encéfalos cortados em micrótomo de congelamento. Além disso, realizamos uma imunofluorescência para GFP para amplificação do sinal da proteína. Os experimentos foram aprovados pela CEUA do ICB-USP(#1743171022).

Nossos resultados mostram a existência do circuito hipotetizado, indicando que os neurônios do BSTpr que se projetam para o VMHvl são os mesmos que recebem aferências do MeA.

Conclusão

Com a confirmação da existência do circuito hipotetizado, é possível que a influência do MeA sobre o VMHvl seja através do circuito desinibitório MeA-BSTpr-VMHvl. Experimentos funcionais são necessários para o entendimento da participação desta via neural na organização da defesa social.

Apoio financeiro

PIBIC-CNPq e FAPESP (2019/26097-7).

MITOCHONDRIAL ALDEHYDE DEHYDROGENASE 1B1 ENZYME VARIANTS AND THEIR CLINICAL IMPLICATIONS

Albuquerque, R.P.¹; Chen C.H.²; Mochly-Rosen, D.²; Ferreira, J.C.B.¹

¹Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP, São Paulo, Brasil.

²Department of Chemical and Systems Biology, Stanford University, USA.

Introduction and goals Aldehydes are highly reactive molecules inside biological systems, where they cause functional impairment to DNA and proteins. The first line of defense against such strike relies on the oxidation of aldehydes to carboxylic acids, catalyzed by enzymes from the aldehyde dehydrogenase superfamily (ALDH). Among the 19 human ALDHs, ALDH2 stands out as the most extensively characterized enzyme, playing a central role in mitochondrial antioxidant defense against toxic compounds such as 4-Hydroxynonenal and acetaldehyde. The human gene for ALDH2 harbors an inactivating mutation E504K (named ALDH2*2) common in east-Asians, responsible for adverse reactions after alcohol consumption, cardiovascular disease and cancer. During Chordates evolution, ALDH2 gene was duplicated giving rise to ALDH1B1, which is still mainly uncharacterized. Large-scale sequencing studies have identified several non-synonymous mutations with high frequencies and so far unknown consequences for protein function and organism homeostasis. Herein, we decided to characterize ALDH1B1's physiological role and the biological consequences of such mutations. **Methods & Results** With transgenic mice lacking the activity of ALDH2, ALDH1B1 or both, we performed a behavioral test after acute ethanol consumption and observed that in the absence of ALDH2 activity, ALDH1B1 mediates alcohol detoxification response. Given the importance of ALDH1B1 in these individuals, we have expressed and purified the seven most frequent ALDH1B1 alleles (R107L, A86V, V253M, V176I, G193Fs, G388Fs, V470A) to better characterize the functional consequences of those mutations. Our in-vitro results have shown different levels of catalytic and stability jeopardy caused by these mutations, but so far, no pharmacological intervention existed capable of reverting such impacts. Thus, we performed a molecular screening using a collection of 193 molecules and identified three activators for this enzyme. Despite working very well in the isolated recombinant protein, our best activator was unable to minimize cell death under different models of aldehydic stress. Still, the knowledge produced here can be used to develop novel activators through SAR, which will be a useful tool for identifying the role of ALDH1B1 in other disease models and can also be a therapeutic option for millions of patients under aldehydic-stress related diseases worldwide. **Conclusion** We were able to show experimentally that ALDH1B1 plays a physiological role of compensation for the east-Asian ALDH2*2 mutation, and that common ALDH1B1 human mutations cause jeopardy to its activity. These results might explain the variability in the outcome of many diseases in ALDH2*2 allele carriers and put ALDH1B1 as an interesting target for oxidative stress mitigation in these individuals. **Financial support** FAPESP, CAPES.

Key words: Aldehyde dehydrogenase; Molecular screening; Drug development

O TREINAMENTO EXCÊNTRICO REDUZ A FIBROSE MUSCULAR ESQUELÉTICA EM CAMUNDONGO MODELO DA SÍNDROME DE MARFAN.

Santos 1, A.R., Nascimento 1, T.L., Rozanski 1, A., Pereira 2, L.V., Aoki 3, M.S., Miyabara 1, E.H.

1 – Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas – USP

2 – Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências – USP

3 – Escola de Artes, Ciências e Humanidades - USP

Introdução e Objetivo: A síndrome de Marfan é uma doença hereditária autossômica dominante caracterizada por distúrbios do tecido conjuntivo. Decorrente de mutações no gene que codifica a fibrilina-1, a síndrome de Marfan está associada à fibrose muscular e atrofia muscular esquelética. Em contraste, o treinamento excêntrico é capaz de mitigar o declínio de massa muscular e conseqüentemente melhorar a função muscular. Nesta perspectiva, este estudo avaliou o efeito do treinamento excêntrico sobre o músculo esquelético de camundongo modelo da síndrome de Marfan.

Métodos e Resultados: Camundongos com síndrome de Marfan e selvagens foram aleatoriamente distribuídos nos grupos controle e treinado. Os camundongos do grupo treinado foram submetidos a um protocolo de corrida em declive de 8 semanas caracterizado por 30 minutos de duração, velocidade constante de 14 m/min, inclinação da esteira de 16° e uma frequência de cinco vezes por semana. A fim de avaliar o efeito do treinamento excêntrico (corrida em declive), foram realizadas análises de Western blotting, RNAseq, RT-qPCR, histoquímica e imuno-histoquímica dos músculos gastrocnêmio e plantar. Diferenças significantes não foram observadas no peso corporal dos camundongos Marfan e selvagem de ambos os grupos. No entanto, o peso úmido dos músculos gastrocnêmio e plantar normalizado pelo peso corporal foi menor em camundongos Marfan quando comparados aos camundongos selvagens. Ademais, foi observado um maior percentual de fibras musculares de menor calibre no gastrocnêmio e plantar dos animais Marfan em relação aos selvagens. Os camundongos Marfan controle apresentaram elevado percentual de fibrose muscular, além de um maior número de fibras musculares arredondadas e reduzida expressão proteica de fibronectina; condição esta que foi revertida pelo treinamento excêntrico. A síndrome de Marfan também induziu aumento do número de macrófagos CD11b+ e neutrófilos Ly6G+ no tecido muscular, bem como aumentou os níveis de RNAm para as proteínas de ligação ao cálcio S100A8 e S100A9 e para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e anti-inflamatória IL-10 nos músculos gastrocnêmio e plantar. Em contraste, o treinamento excêntrico atenuou esses efeitos nos camundongos Marfan.

Conclusão: Esses resultados sugerem que o treinamento excêntrico melhora a morfologia da fibra muscular e atenua a fibrose e a inflamação muscular em camundongo modelo da síndrome de Marfan, restaurando a expressão de fibronectina e diminuindo a expressão de S100A8/A9.

Apoio financeiro: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

INIBIÇÃO DO NF-KB DE CARDIOMIÓCITOS ALTERA O PERFIL DE FIBROBLASTOS E PREJUDICA A FUNÇÃO CARDÍACA NA HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA POR HORMÔNIO TIROIDIANO Sougey, WWD, Cesaro, AP.; Vieira-Júnior, DN; Barreto-Chaves, MLM. Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas- USP.

Introdução e objetivos: A sinalização pelo hormônio T3 no tecido cardíaco pode promover a hipertrofia cardíaca. Esta, a depender da intensidade e duração do estímulo, pode tornar-se descompensada, induzindo morte de cardiomiócitos (CM) e deposição de tecido fibrótico, resultando na disfunção cardíaca. Foi demonstrado que camundongos com mutação tripla impedindo a ativação do NF-kB nos cardiomiócitos (3M) apresentaram atenuação da hipertrofia cardíaca induzida por T3. Sabendo que CM e fibroblastos (FC) mantêm interações intercelulares, e o evidente envolvimento dos FC no processo de descompensação da hipertrofia cardíaca, investigamos a influência do NF-kB de cardiomiócitos sobre aspectos morfofuncionais cardíacos e de ativação de fibroblastos na hipertrofia induzida por T3.

Métodos e Resultados: camundongos C56Bl/6 e 3M foram tratados com veículo ou T3 (7, 14 ou 35ug/100g, intraperitoneal) por 14 ou 28 dias. A função cardíaca foi avaliada por ecocardiograma. O coração foi coletado para análises histológicas de hipertrofia (por WGA) e deposição de colágenos (por PicroSirius), e das expressões gênica e proteica de marcadores de ativação de fibroblastos (por RT-PCR e western-blot). Em cultura, CM e FC extraídos de ratos neonatos foram separados por gradiente de Percol. Cardiomiócitos foram tratados com T3 (10nM) por 24hr, e em seguida esse meio condicionado foi utilizado para tratamento de fibroblastos, por 6 ou 24h. O RNA total foi extraído para avaliação da expressão gênica de marcadores da ativação de fibroblastos (RT-PCR). CEUA: 1701150921. Imagens obtidas em microscópio e quantificadas pelo *software ImageJ* v.6. Dados analisados no *GraphPad Prism* v.6 (t-Student, ANOVA uni ou bidirecional), 95% de confiança, média +-DP. Foi observada atenuação da hipertrofia cardíaca em animais 3M tratados com T3 (14 ou 35ug/100g) por 28 dias, sem alteração na deposição de fibrose intersticial. Os animais 3M-T3 (14ug/100g) não demonstraram alterações na expressão gênica associada à ativação de fibroblastos, mas obtiveram menor expressão proteica de colágeno 3 e alfa-SMA. Os animais 3M-T3 (35ug/100g) apresentaram aumento dos marcadores gênicos de ativação de fibroblastos, além de prejuízo da função cardíaca (diminuição da fração de encurtamento, tempo e fração de ejeção, e alteração da razão E/E'). A nível celular, o tratamento de FC por 6h com o meio proveniente de CM-T3 promoveu a diminuição da expressão gênica de TGF-B e CTGF, e aumento de colágeno 3. Após 24h, observou-se diminuição da expressão de alfa-SMA e colágeno 3. **Conclusão:** O NF-kB de cardiomiócitos é importante para manutenção da função cardíaca na hipertrofia induzida por T3. Ademais, o perfil de fibroblastos cardíacos é diretamente influenciado pelos cardiomiócitos nesse contexto. **Apoio financeiro:** CAPES, FAPESP.

Resumo para Congresso do Instituto de Ciências Biomédicas

Título: The absence of the AT2 receptor exacerbates the pathological effects of aging in the mouse heart

Zacarias-Rodrigues, L.M.¹, Teixeira, S.A.², Muscará, M.N.², Santos, R.A.S.³, Takano, A.P.C.¹, Barreto-Chaves, M.L.M.¹

1. Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas – USP
2. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas – USP
3. Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

The heart is subject to different pathophysiological stimuli, which can lead to the development of cardiovascular diseases. Aging is one of the risk factors for these diseases, with the activation of inflammatory cascades with the release of pro-inflammatory cytokines. In addition, the production of reactive oxygen species and activation of senescence pathways occur, which lead to structural and functional changes in the heart. One of the systems that directly acts on cardiac function and morphology is the renin-angiotensin system (RAS). Its main effector is Ang II, which, when binding to AT1 and AT2 receptors, performs, for the most part, antagonistic responses. Thus, hypertrophic, oxidative and inflammatory responses are associated with AT1 and cardioprotective responses, with AT2. The hypothesis of the present study is that the AT2 receptor exerts cardioprotective effects in aging and that its suppression triggers the activation of inflammatory processes, with the activation of inflammasomes, which contributes to the inflammatory phenotype associated with aging. To test this, we used wild-type (WT C57BL/6) or AT2 receptor knockout mice, aged 4-5 months (young) or 18 months (aged). During aging, we observed a reduction in survival of AT2-KO mice, a significant increase in cardiac trophism, increased tissue fibrosis and impaired diastolic function, and the senescence markers p53 and p21 (vs. aged WT), as well as increased expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines. However, these changes were independent of redox alterations in the experimental groups. Our findings suggest the participation of the AT2 receptor in mitigating the pathological processes associated with aging in cardiac tissue and its absence accelerates these effects during aging.

Proteomic Signature of the Extracellular Matrix in Adrenocortical Neoplasms

Henrique Sanchez Ortega^{1*}, Jean Lucas Kremer^{1*}, Talita Souza-Siqueira³, Claudia Blanes Angeli², Maria Candida B V Fragoso⁴, Leo Kei Iwai⁵, Giuseppe Palmisano^{2,6}, Claudimara Ferini Pacicco Lotfi¹

1. Laboratory of Cellular Structure and Function, Dep. of Anatomy; Institute of Biomedical Science (ICB), University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.
2. Glycoproteomics Lab., Dep. of Parasitology, ICB-USP.
3. Laboratory of Cellular, Genetic and Molecular Nephrology, School of Medicine-USP.
4. Adrenal Unit, Laboratory of Hormones and Molecular Genetics LIM/42, Division of Endocrinology and Metabolism, Clinics Hospital, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil.
5. Laboratory of Applied Toxicology, Center of Toxins, Immune-response and Cell Signaling LETA/CeTICS, Butantan Institute, São Paulo, Brazil.
5. School of Natural Science, Macquarie University, Sydney, Australia.

* Contributed equally

The extracellular matrix (ECM) comprises macromolecules that form a complex three-dimensional network, filling the intercellular spaces and maintaining tissue structure and function. The ECM regulates essential cellular processes, including adhesion, differentiation, and cell signaling^{1, 2}. In rat and human normal adrenal glands, composed of a cortex and medulla surrounded by a capsule³, the ECM was described by Kremer et al. (2024)^{4, 5}. In addition, the impact of the ECM on proliferation and steroidogenesis was described in the normal and tumor adrenal cortex⁶⁻¹⁰. This study aims to provide insights into the composition and regulation of the ECM in the human adrenal cortex neoplasm microenvironment. The ECM composition was compared to adult human normal adrenal cortex and adrenocortical neoplasms. We described by proteomic analysis the ECM protein signatures of the human normal adrenal (HNA, n=5) obtained from the USP-Capital Death Verification Service and neoplasm fragments of Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia (PMAH) with (w) ARMC5 mutation (n= 5) and without (wt) mutation (n= 5); Adrenal Cortical Adenoma (ACA, n=8); Adrenal Cortical Carcinoma (ACC, n=8) and Oncocytic Adrenal Carcinoma (OACC, n=7) obtained from the Adrenal Unit, Laboratory of Hormones and Molecular Genetics LIM/42, FMUSP (Ethics Committee nº 6.524.377). The sample preparation for proteomic analysis was performed as described by Kremer et al. (2024)⁵, without samples decellularization. Raw LC-MS/MS files were processed using MaxQuant 2.4.9 software/Andromeda search engine against human databases and Perseus software v2.0.11. Proteins were annotated

using UniProtKB codes (<https://www.uniprot.org/>) and Gene Ontology- AmiGO2 (GO) (<https://amigo.geneontology.org/amigo/landing>). Protein-protein interaction networks and functional enrichment analysis were performed using the STRING platform (<https://string-db.org/>). In total, 362 ECM-proteins were qualitatively identified and validated in the Human Matrisome DB 2.0 (<https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014647>, accessed in May 2024). Of the total ECM-proteins, 175 were quantitatively analyzed and categorized into 59 glycoproteins, 18 collagens, 54 ECM regulators, 8 proteoglycans, 22 ECM-affiliated proteins, and 14 secreted factors. Statistical comparison between groups showed 19 proteins differentially expressed in HNA vs. PMAH w; 12 proteins HNA vs. PMAH wt; 15 proteins HNA vs. ACA; 25 proteins HNA vs. ACC; 26 proteins HNA vs. OACC; 9 proteins PMAH w vs. PMAH wt; 26 proteins ACA vs. ACC; 15 proteins ACC vs. OACC. The findings will be validated through database analysis and histochemical and immunohistochemical approaches. Supported by Fapesp.

- 1 Naba, A., et al., *The extracellular matrix: Tools and insights for the "omics" era*. Matrix Biology, 2016. 49: p. 10-24.
- 2 Hynes, R.O., *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*. Science, 2009. 326(5957): p. 1216-1219.
- 3 Lotfi, CFP, Kremer, JL, dos Santos Passaia, B., & Cavalcante, IP (2018). O córtex adrenal humano: controle e distúrbios do crescimento. Clinics, 73.
- 4 Kremer, J. L et al., Extracellular matrix protein signatures of the outer and inner zone of the rat. Journal of Proteomic Research, 2024.
- 5 Kremer, J. L., Ortega, H. S., Souza-Siqueira, T., Angeli, C. B., Iwai, L. K., Palmisano, G. & Lotfi C. F. P. (2024). Proteomic profiling of the extracellular matrix in the human adrenal cortex. Matrix Biology Plus accepted.
- 6 Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N. Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-associated functions. J Endocrinol 193(3):331–47 (2007).
- 7 Chamoux E, Otis M, Gallo-Payet N. A connection between extracellular matrix and hormonal signals during the development of the human fetal adrenal gland. Braz J Med Biol Res. 38(10):1495-503 (2005).
- 8 Chamoux E, Nancy A, Lehoux JG, Gallo-Payet N. Fibronectin, laminin, and collagen IV interact with ACTH and angiotensin II to dictate specific cell behavior and secretion in human fetal adrenal cells in culture. Endocr Res. 28(4):637-40 (2002).
- 9 Gallo-Payet N, Battista MC. Steroidogenesis-adrenal cell signal transduction. Compr Physiol. 4(3):889-964 (2014).
- 10 Zheng S, Cherniack AD, Dewal N, Moffitt RA, Danilova L, Murray BA, Lerario AM, et al. Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. Cancer Cell. 30(2):363 (2016).

**DEPARTAMENTO DE
BIOLOGIA CELULAR E
DO
DESENVOLVIMENTO**

HIGH LEVELS OF MICRORNAS 221 AND 222 REDUCE CELL DEATH AND ENHANCE CELL PROLIFERATION, CONTRIBUTING TO THE SURVIVAL OF PAPILLARY THYROID CARCINOMA CELLS.

Julia Mangolin Tiepolo 1, Marco Rodrigues Cheruti 1, Gabriella Malheiros Moraes 1, Cilene Rebouças de Lima 1,2, Marinilce Fagundes dos Santos 1.

1 Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, ICB-USP.

2 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Cruzeiro do Sul – UNICSUL.

BACKGROUND: Most thyroid cancer deaths are related to the histological subtype papillary thyroid carcinoma (PTC) refractory to radioactive iodine treatment. Even with advancements in treatment options, a definitive cure remains elusive. Consequently, extensive research has been conducted on the various molecular mechanisms involved in PTC development. MicroRNAs (miRs), such as miR-221 and miR-222, are found in high levels in PTC and are associated with tumor aggressiveness, invasiveness, and metastasis. These miRs are thus considered potential targets for therapy in PTC, although their exact molecular roles are not fully understood. Our findings indicate that high levels of miR-221 and miR-222 enhance the viability of PTC cells while reducing their levels has the opposite effect. Furthermore, *in silico* analysis suggests that caspase-3, a key player in the apoptosis process, is both a predicted and confirmed target of miR-221 and miR-222. **OBJECTIVES:** To evaluate the role of miR-221 and miR-222 in cellular proliferation and death by apoptosis in two human PTC cell lines. **METHODS:** Functional assays were performed in PTC cell lines (TPC-1 and BCPAP) to suppress and overexpress miR-221 and miR-222 using specific exogenous oligonucleotides. After 24 h of transfections, both miRs expressions were evaluated by qPCR, and TUNEL and BrdU incorporation assays were performed to evaluate apoptosis and cell proliferation, respectively. Caspase-3 protein expression was evaluated by western blotting. **RESULTS:** Suppression of miR-221 and miR-222 (~75-90% as compared to the control transfected groups) increased the number of TUNEL-positive cells (by ~2,5-11x in TPC-1 and ~1,5-3,5x in BCPAP), decreased the number of BrdU-positive cells (by ~25-40% in TPC-1 and ~35-70% in BCPAP) and increased levels of caspase-3 by 2-3 times. No differences were observed after additional overexpression of these miRs. **CONCLUSION:** Both miR-221 and miR-222 positively regulate PTC cell survival, reducing cell death by apoptosis potentially through caspase-3 suppression, and stimulating cell proliferation. Acknowledgments: FAPESP, CNPq, and CAPES.

Abstract

EFFECT OF FLUID SHEAR STRESS ON TUMOR AND ENDOTHELIAL CELLS AND IN THE PROMOTION OF TUMOR-ENDOTHELIAL ADHESION

Najophe, S. E., Villarinho, N.J., Freitas, V.M.

Department of Cellular and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, SP-Brazil

Introduction and Objectives

Breast cancer is one of the most common types of cancer in women worldwide, resulting in high mortality rates. Metastasis, like in other types of cancer, is responsible for the majority of breast cancer-related deaths, as well as recurrence and poor prognosis with respect to the disease. In understanding the process of metastasis, attention has been brought on fluid shear stress, as well as its effect on tumor cells, endothelial cells and in the adhesion of tumor cells to endothelial cells. Based on this, the current study aims to investigate the effects of fluid shear stress on breast tumour cells (MDA-MB-231 and MCF7), endothelial cells (HUVECs), and tumour cell adhesion to endothelial cells.

Methods and Results

Using the Ibidi system and orbital shaker, this study aims to subject cells (tumor and endothelial cells) to fluid shear stress, simulating the circulatory system. Firstly, western blot and immunofluorescence will be used to investigate the expression of GIPC1, SAHH2, SNX3, ADA, GGT5, and DUSP3 after HUVECs are exposed to shear stress. The impact of fluid shear stress on the viability, morphology, and drug resistance of breast tumour cells will also be investigated. Furthermore, knockdown of the aforementioned proteins in HUVECs will be performed to better understand the functional roles they may play in the cells as well as the process of tumor-endothelial cell adhesion.

As part of the first objective of this study, we observe that the protein expression of SNX3 and SAHH2 reduces upon exposure to shear stress.

Conclusion

While these findings are inconclusive, they underscore the need for more conclusive investigation to get proper insight into the effect of fluid shear stress in the selected proteins.

Financial Support

CAPES, FAPESP, CNPq

ROLE OF POSTMITOTIC TRANSCRIPTION FACTORS IN DORSAL INTERNEURONS LINEAGE DEFINITION.

Vitória Samartin Botezelli¹, Carolina Purcell Goes¹, Chao Yun Irene Yan¹.

¹Department of Cellular and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo.

One of the central questions in developmental biology is how different lineages derive from a common progenitor. The neural tube is an ideal setting to address this question, as it harbors at the same axial level, proliferating, postmitotic, and differentiated cells, organized medially-laterally. During differentiation, the neuronal lineages are organized dorso-ventrally. Particularly, in the dorsal region, the sensory interneurons derive from six different lineages (dI1-6). The postmitotic phase is a key moment for lineage decision, however, the role of the early postmitotic transcription factor in this process is not well understood. SCRATCH2 (SCRT2) is a neural postmitotic transcription factor whose expression field overlaps with lineage-defining transcription factors in the dorsal neural tube. First, our goal was to assess the regulatory effect of SCRT2 in the dI3 lineage definition by quantifying ISLET-1 expression. SCRT2 repressed the expression of ISLET-1 in the dorsal subpopulation of dI3 cells. We then investigated if SCRT2 could act directly on ISLET-1 transcription. Through silico data analysis, such as CUT&RUN, ATAC-seq, and JASPAR screening, we identified a putative regulatory region upstream of the ISLET-1 locus that is active in the neural tube. SCRT2 interacts with this region to repress transcription in the neural tube. Taken together, the results presented here indicate that early postmitotic transcription factors can play a direct role in defining neuronal lineages during somatosensory development.

Ethics committee: CEUA-ICB-9506131021.

Funding: CAPES/FAPESP.

THE EFFECTS OF LARGE EXTRACELLULAR VESICLES FROM ER STRESSED BREAST CANCER CELLS ON ADHESION, PERMEABILITY, MIGRATION AND ANGIOGENESIS OF ENDOTHELIAL CELLS

Yamagata¹, A.S., Teles¹, R.H.G., Villarinho¹, N.J.; Terçarioli¹, G.R., Ikegami², A., Ristow³, A., Freitas¹, V.M., Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences - USP

Introduction and objectives: To colonize a distant site, the cancer cells need to increase endothelial permeability and stimulate angiogenesis. Extracellular vesicles (EV) are means of communication between cells, and tumor EV can favor the metastatic process. ER stress is very typical in the cells of the tumor microenvironment. We aim to investigate if EV released from cancer cells in response to ER stress alter endothelial permeability and angiogenesis.

Methods and Results: ER stress was induced in MDA-MB-231 breast cancer cells with tunicamycin, and large extracellular vesicles (LEV) were isolated by centrifugation. The LEV were characterized by nanoparticle tracking analysis, immunogold by transmission electron microscopy, Western blot and high performance liquid chromatography (HPLC). Adhesion was assessed by adhesion assay, permeability was assessed by transwell assay, ER stress markers were quantified by Western blot, migration and angiogenesis were assessed by scratch assay and tube formation assay. Tunicamycin was not detected in LEV from tunicamycin treated cells (LEV T). The results suggest that LEV T may not induce ER stress, although there was a slight tendency. Preliminary results indicate that LEV T increase permeability compared to control LEV (LEV C). LEV T increased migration relative to LEV C, but no difference was found in adhesion and tube formation.

Conclusion: ER stress may modify the properties of tumor LEV, promoting endothelial permeability and migration.

Keywords: breast cancer, ER stress, extracellular vesicles, permeability, angiogenesis

Funding: processo FAPESP 2020/15751-5

MASPIN/SERPINB5 IS A CYTOSKELETON-BINDING PROTEIN REGULATING EPITHELIAL CELL SHAPE

Da Silva, L.E.¹, Paim, L.M.G.², Menezes, A.P.J.³, Cunha, J.P.C.³, Bechstedt, S.² and Cella, N.¹

¹Department of Cell and Developmental Biology, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil.

²Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, Canada.

³Center of Toxins, Immune Response and Cell Signaling-CeTICS, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.

Introduction and objectives: Maspin/SerpinB5 is an abundant and pleiotropic protein mostly expressed by epithelia. Initially described as a tumor suppressor, it has been reported as a regulator of cell adhesion, migration, and invasion. How endogenous Maspin orchestrates these cellular processes is poorly understood. We thus set out to investigate the underlying molecular mechanisms by which Maspin controls epithelial homeostasis.

Methods and results: We combined AP/MS analysis and *in vitro* reconstitution assays to demonstrate that endogenous Maspin directly interacts with microtubules and microfilaments. GFP-tagging of endogenous Maspin by a CRISPR/Cas9 knock-in strategy and immunostaining further showed that it distributes at the cortical cytoskeleton and mitotic spindle zone. Depletion of endogenous Maspin by RNAi and CRISPR/Cas9 in three distinct epithelial cell lines disrupts cell-cell adhesion, reorganizes the cytoskeleton and results in upregulation of mesenchymal markers during interphase. In mitotic cells, loss of Maspin induces abnormal cell retraction and disorganization of cortical F-actin. Moreover, Maspin suppresses microtubule growth *in vitro* and in cells.

Conclusion: Collectively, these results demonstrate that Maspin acts as an adhesion-cytoskeleton integrator, directly modulating cells' shape and preventing an EMT-like state in epithelial cells.

Financial support: CAPES (88887.506347/2020-00, 88887.816589/2023-00 and 88887.835982/2023-00); FAPESP (2021/12268-4).

BMP SIGNALING PATHWAY AND THE EVOLUTION OF THE EXTRACELLULAR MATRIX IN LENS PLACODE

Ikesaki S.M. (1), Magalhães C. G. (1), Jaeger R. (1), Yan C. Y. I. (1)

(1) Department of Cellular and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil.

Introduction and Aim

Bone morphogenetic protein (BMP) pathway signaling is essential for embryonic development. BMP is involved in several embryonic events, including, but not limited to, the development of the central nervous system and the formation of the lens placode. The extracellular matrix (ECM) is also important for embryonic development, playing a crucial role in tissue organization and morphogenesis. It is likely that both ECM and BMP signaling are involved in optic morphogenesis.

Our laboratory has observed previously that the BMP pathway is important for the thickening of the lens placoidal ectoderm epithelial and changes in the architecture of the ECM in the optic region. In this project, we propose to investigate in more detail the relationship between canonical BMP signaling and the optical ECM. Our first hypothesis is that a BMP pathway is sufficient for ECM changes in regions of the lens.

Methods and Results

To test our hypothesis, we will ectopically activate the BMP pathway in the non-placoidal epithelium and observe whether the ECM changes - typical of the placoidal region - occur only with this stimulus. The second is that, for the evolution of the ECM and the lens placode, BMP uses the canonical pathways centered on the intracellular mediator Smad. To verify this, we will overexpress a dominant-negative form of Smad1 (SMAD DN) in the placode. The predicted outcome is that DN-Smad will inhibit placoidal ECM changes.

Conclusions

Together, these results would shed light on the relationship between ECM and BMP in lens placode development.

Keywords: BMP; extracellular matrix; lens placode

CEUA: 9506131021

Funding agencies: CAPES and FAPESP

FERRAMENTAS INTERATIVAS DE APRENDIZAGEM PARA O ENSINO DE BIOLOGIA CELULAR

Xavier da Silva, I. S.; Siviero, F.

Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos:

A Biologia Celular é uma disciplina fundamental nos cursos de ciências da saúde e biológicas, mas enfrenta desafios significativos de ensino e aprendizagem. Este projeto visa desenvolver e avaliar ferramentas de aprendizagem ativas para o ensino de Biologia Celular, com o objetivo de superar dificuldades como o reconhecimento de estruturas celulares em imagens de microscopia e a aplicação prática dos conceitos ensinados.

Métodos e Resultados:

Duas ferramentas foram desenvolvidas: atividades interativas em sala de aula baseadas em estudos de casos clínicos e uma versão *online* dessas atividades, utilizando HTML5, CSS3, JavaScript e H5P para criar exercícios interativos acessíveis em múltiplos dispositivos. A eficácia das ferramentas será avaliada por meio de questionários preenchidos pelos estudantes (CAAE: 15053619.3.0000.5467), fornecendo dados quantitativos sobre a eficiência e a receptividade das atividades. Resultados preliminares indicam um aumento significativo na compreensão dos conceitos de Biologia Celular e maior engajamento dos estudantes nas aulas.

Conclusão:

As ferramentas de aprendizagem ativas desenvolvidas mostraram-se eficazes na superação de obstáculos de ensino na Biologia Celular, promovendo uma melhor compreensão dos conceitos e maior interesse dos estudantes. A implementação dessas ferramentas em salas de aula e *online* oferece um modelo replicável para outras disciplinas e instituições.

Apoio Financeiro:

PRG-USP; PUB-USP.

TARGETING *miR-146B-5p*, A HIGHLY EXPRESSED miRNA IN AGGRESSIVE THYROID CANCER, WITH THE ANTISENSE SPONGE SYSTEM

Duarte¹, I.; Fuziwara¹, C. S.; Saito K.C¹.; Kimura¹, E.T.

¹Laboratory of Molecular Biology of Cancer, Department of Cell and Development Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo.

Introduction: Thyroid cancer is the most prevalent endocrine malignancy, and anaplastic thyroid cancer (ATC) is one of the most aggressive forms of human cancer associated with a survival rate of less than six months. MicroRNAs (miRs) play a crucial role in regulating gene expression, and their dysregulation is observed in various types of cancer. Notably, high levels of miR-146b expression are a hallmark of thyroid cancer. miRs regulate target genes by imperfectly pairing with the 3'UTR of mRNA. The sponge system is a molecular tool that inhibits the activity of specific microRNAs by decoying the miR-mRNA interaction.

Objective: The aim of this study is to investigate the effect of an antisense sponge for miR-146b-5p on the biology and transcriptome of ATC thyroid cancer. **Methods:** Two different sponges, containing either 6 (6X) or 12 (12X) tandem repeats of an antisense sequence complementary to miR-146b-5p, as well as a scramble miR-146b plasmid as a control, were cloned into the MSCV-puro plasmid. These plasmids were then transfected into the ATC KTC2 cell line. Cell counting, MTT assays, and wound assays for cell migration were performed to observe cancer biology. Activation of Notch, NFκB, and β-catenin signaling was evaluated using luciferase reporter assays. NGS sequencing by HiSeq 2500 Illumina was performed on cells with the 12X sponge and control cells, and transcriptome data were compared with TargetScan's predicted targets. Signaling enrichment was performed using Enrichr. **Results:** We established KTC2-6X and KTC2-12X cell lines that overexpress miR-146b-5p sponges. Both miR-146b sponges (6X and 12X) in KTC2 cell lines showed a reduction in cell migration, though no change was observed in cell counting and MTT assays. Both sponge cell lines also showed decreased activation of Notch, NFκB, and β-catenin oncogenic signaling pathways, and RNA sequencing analysis revealed downregulation of genes tested by luciferase reporter assays. Among more than 300 predicted targets by TargetScan, the sponge system modulated 38 targets of miR-146b, including NRAS, BAG1, and BRD4, which are known to be involved in thyroid cancer and transcription regulation. Signaling enrichment analysis based on GO molecular function using Enrichr revealed pathways related to histone methyltransferase activities, nuclear receptors, and double-stranded RNA binding. **Conclusion:** The sponge system was effective in inhibiting the highly expressed miR-146b-5p and attenuating its oncogenic effects in ATC. Thus, targeting miR-146b-5p with the sponge system presents a promising novel strategy as an adjunct therapy in highly aggressive and lethal thyroid cancer.

Funding: Grants from FAPESP (2019/17282-5, 2019/25116-8), CNPq (409443/2021-2, 311210/2021-0) and PUB-USP.

EARLY WEANING AFFECTS THE EXTRACELLULAR MATRIX, MIGRATION AND PROLIFERATION INTESTINAL STEM CELLS

Costa, M.A.S; Rattes, I.C; Kuriyama, M.A.A; Oliveira, V.R; Gama, P.

Department of Cell and Developmental Biology, ICB USP

Introduction and aim: The niche of intestinal stem cells (ISCs) is formed by physic and cellular components, which respectively contain glycans, laminin γ 1, biglycan, fibronectin, and myofibroblasts. However, as the small intestine can be affected by dietary patterns, it is still unknown whether the niche of ISCs is influenced by early weaning (EW). The aim of this study was to evaluate whether and how EW influences the organization of extracellular matrix (EM) and the renewal and migration of ISCs. **Methodology and Results:** The procedures for jejunal collection and processing were approved in CEUA ICB USP 4532180222. We used Wistar rats that were regularly suckling (S) or EW to collect the jejunum at 18, 60, and 120 postnatal days (pnd), and quantified the areas and intensity of the neutral glycans, the area of stem cells niche, and the number of mitosis per niche. We performed immunohistochemistry (IHC) for EM on the pericryptal region, and used BrDU/EdU for proliferation/migration observation. At 18 pnd, EW increased the niche area, PAS intensity and mitotic cell number. Unlike the analyzes of the area occupied by neutral glycans, there was a significant difference in the evaluation of intensity between young animals 18 (S/EW) and adults of the same ages 60 (S/EW) and 120 days (S/EW), in which the EW animals of all ages show an increase in intensity compared to the S group. The distribution of the γ 1 chain of laminin was not altered, and at 120 pnd, we observed a reduction of biglycan after EW in the muscularis mucosa. Also EW slowed the migration of cells in the crypt-villus axis at 18 pnd, with BrdU+ cells in the crypt-villus axis and EdU+ cells in the crypt. Therefore, we suggest that EW increases the number of BrdU+ cells in the Vili due to the delay in cell migration, as well as decreasing the number of EdU+ cells (S phase of the cell cycle) at 21 days. Finally, EW stabilizes the number of EdU+ proliferative cells, when compared to the S animal, which has a significant increase from 18 to 21 days. We observed that we did not have changes in the pericryptal area occupied by fibronectin among the 18-day-old animals. On the other hand, we observed a decrease in this area in adult animals, 60 and 120, subjected to EW. **Conclusions:** We suggest that EW affects the components of the ISC niche that might influence its proliferation and migration.

Keywords: laminin; biglycan; fibronectin; BrdU; early weaning.

Supported by FAPESP (2021/14633-1; 2020/05117-7); CAPES code 01.

PRION PROTEIN AS AN INVASION REGULATOR IN GLIOBLASTOMA BIOLOGY

Souza, M.C.S, Fernandes, C.F.L., Coelho, B. P., Santos, T. G., Sousa, B. P., Iglesia, R., Costa, E., *Lopes, M. H.*, Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences.

Introduction and Aims: Glioblastoma (GBM) is one of the deadliest tumors and is driven by a subpopulation of glioblastoma stem cells (GSCs) that contribute to its invasive and aggressive behavior, leading to poor therapeutic outcomes and reduced patient survival. Current therapeutic strategies are insufficient to control the disease, as reflected by a dismal median survival of less than 15 months from diagnosis. Due to GBM cellular and molecular heterogeneity, modeling the disease remains a challenge. Extensive research has focused on unraveling the molecular and cellular mechanisms underlying GSCs biology. Our group has proposed the cellular prion protein (PrP^C), encoded by the PRNP gene, as a scaffold protein that integrates signaling platforms involved in GSCs maintenance. Whereas GSCs may have an elevated invasive potential compared to non-stem tumor cells, a deeper understanding of the intracellular pathways modulated by PrP^C is essential to identify novel targets for GBM treatment.

Methods and Results: We have analyzed bulk-RNA sequencing (RNA-seq) data from patient-derived xenografts (PDX) and established in vitro preclinical experimental models. Through this analysis, we identified differentially expressed genes (DEGs) linked to adhesion signaling pathways in PDX cells with high PRNP gene expression. Using a PrP^C knockout model (PrP^C-KO) in U251 cells, we observed a morphological change and a decrease in the expression of proteins involved in cell adhesion, migration, and invasion steps in PrP^C-KO cells. We also observed a change in the localization of ITGB1 and Vimentin. We knocked down PrP^C (PrP^C-KD) in GSCs, and observed in functional assays, decreased proliferation, migration, and invasion in PrP^C-KD cells. Since decreased PrP^C levels may be associated with impaired invasion, we began establishing brain organoids derived from human induced pluripotent stem cells to co-culture with GSCs. Upon our analysis, we observed a consistent 3D cytoarchitecture and cellular marker expression in brain organoids. Moreover, we have co-cultured brain organoids with GSCs, creating a platform to investigate the interplay between tumor cells and brain tissue.

Conclusions: Given that GBM invasiveness hinders curative treatment by preventing complete surgical resection, our data shed light on how modulated PrP^C may influence GBM cell adhesion, migration, and invasion.

Financial support: FAPES, CNPq, CAPES

UNRAVELING ENDOCYTIC ROUTES AND THE INFLUENCE OF BREAST CANCER SMALL EVS ON HUVEC BEHAVIOR

Villarinho, N. J. (1), Sung, B. H. (2), Yamagata, A. S. (1), Teles, R. H. G. (1), Pereira, A. Z. P (3), Salardani, M. (3), Weaver, A. M. (2), Freitas, V. M. (1)

(1) Dept. of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

(2) Dept. of Cell and Developmental Biology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA.

(3) Functional Proteomics Laboratory, Institute of Science and Technology, Federal University of São Paulo, São José dos Campos, SP, Brazil

INTRODUCTION AND AIM: Metastasis orchestrates tumor cell dissemination from the primary site, navigating distant organs via the circulatory system. Small Extracellular Vesicles (SEVs) secreted by cancer cells augment vascular permeability, facilitating tumor cell extravasation. However, the mechanisms underlying SEV interaction with endothelial cells, particularly under flow shear-stress (FSS), remain elusive. Our study aims to elucidate how breast cancer-derived SEVs engage and are internalized by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) under FSS or not.

METHODS AND RESULTS: Using LC/MS proteomics and protein-protein interactions, we scrutinize HUVEC responses under FSS and static conditions, alongside with SEVs isolated from MDA-MB-231. HUVEC, pre-treated with pharmacological agents targeting endocytosis pathways (Dynasore, Methyl β -cyclodextrin - M β CD, and Pitstop2), are exposed to SEVs isolated from MDA-MB-231 CD63.mScarlet⁺ for 30min or 4h. Proteomic analysis unveils distinct gene expression profiles in FSS, interacting with analogous SEV proteins from control conditions, albeit with gene replacements (TES and TPM1). Enriched in cell matrix, cytoskeleton organization, and adhesion Gene Ontology terms, these interactions hint at implications for endothelial behavior. SEVs disrupt static HUVEC monolayers by 11%, with Pitstop2 inhibiting uptake by 16% (30min), and M β CD by 39% (30min) and 58% (4h), emphasizing clathrin and caveolin-dependent endocytosis significance. Our subsequent phase involves replicating these experiments with HUVEC under FSS, while employing siRNA targeting clathrin and caveolin. This approach aims to enhance our comprehension of the pivotal role these pathways play in facilitating SEV uptake by HUVEC under FSS.

CONCLUSION: Our findings underscore the multifaceted interplay between SEVs and HUVEC, shedding light on potential pathways influencing endothelial permeability and fostering a pro-metastatic milieu.

Keywords: Endothelial Cell, Endocytosis, and Small Extracellular Vesicle

Funding support: CAPES, CNPQ and FAPESP

REGULATION OF *miR-128-3P* SPLICING AND THE CONSEQUENT CHANGES IN *NOVA1* AND *PDIA5* EXPRESSION

Cruz, L.O.R., Coltri, P.P., Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences

Introduction and Objectives: Among the steps to gene expression is splicing, a co-transcriptional process catalyzed by the spliceosome that consists in the formation of a mature mRNA molecule by removing the introns and joining the exons. Alternative splicing is a very common event in mammals, where different mRNA molecules are formed from the same pre-mRNA. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that act post-transcriptionally modulating gene expression, either by preventing mRNAs from being translated or by degrading mRNAs. Their biogenesis is possibly related to the splicing process, as many miRNAs are intronic. In our laboratory, we work with the hypothesis that alterations in splicing may alter the expression level of proteins important for disease development. miRNAs are related to the development of various diseases, including different types of cancer, a process that occurs, for example, when miRNA reduces the expression of tumor suppressors. Therefore, this project aims to investigate whether splicing regulatory proteins can modify the splicing of the introns thus modifying the expression of target mRNAs. This project specifically studies the intron housing miR-128-3p and the main targets of this miRNA, NOVA1 and PDIA5 mRNAs, proteins involved in RNA metabolism and protein folding. We intend to verify whether splicing regulation of miR-128-3p leads to modifications in the cellular phenotypes.

Methods and Results: Reporter plasmids have been constructed and transfected into cell cultures (HEK-293T), followed by luciferase assays.

Conclusion: We observed that the luciferase assay can detect target sequence alterations. Improvements in the experiments are underway, and analysis of splicing modifications on miR-128-3p and its targets will be performed.

Financial Support: CNPq, FAPESP.

O PAPEL DO GENE *PRNP* HUMANO NA CILIOGÊNESE DO GLIOBLASTOMA

Sousa, B. P., Souza, M.C.S., Lopes, M.H., Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos

O glioblastoma (GBM) é um tumor cerebral altamente letal em adultos para o qual não existe terapia eficaz. Diversos fatores contribuem para sua agressividade, dentre eles a sua grande heterogeneidade celular e molecular e a presença de células-tronco de glioblastoma (CTGs), cruciais para resistência ao tratamento e recorrência do tumor. Evidências mostram que a expressão gênica da proteína prion celular (PrP^C), codificada pelo gene *PRNP*, está aumentada em GBM quando comparada com outros tumores cerebrais de menor agressividade, como astrocitomas IDH-mutante. Dados obtidos pelo nosso grupo demonstram que a PrP^C tem um papel relevante em CTGs, agindo como uma proteína *scaffold*, integrando plataformas de sinalização, modulando a proliferação e auto-renovação dessas células. Trabalhos prévios de nosso grupo apontam para uma atuação crítica da PrP^C na ciliogênese, em GBM. Uma vez que o papel de PrP^C na ciliogênese e na sinalização via cílios primários se mantém ainda pouco conhecido buscamos, através de análises *in silico* de dados de *single-cell RNA sequencing*, desvendar a associação entre *PRNP* e genes essenciais para o funcionamento dessa organela.

Métodos e Resultados

Para realizar nossas análises, utilizamos dados de *scRNA-seq* de GBM. Realizamos diversas análises de expressão gênica, *differentially expressed genes* (DEGs) e enriquecimento de vias. Observamos que as células do subtipo *AC-like* (astrocyte-like), caracterizada pela expressão marcadores astrocíticos (*S100B*, *GFAP*, *SLC1A3*, *GLAST* e *MLC1*), apresentam os maiores níveis de *PRNP*. Em seguida, realizamos uma busca pelos DEGs, dentro das subpopulações de *AC-like*, em comparação com todos os outros. Na análise de enriquecimento de vias, utilizando dos DEGs, encontramos funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares relacionados aos cílios primários. Ao analisarmos a expressão gênica de *IFT88* e *ARL13B*, que codificam proteínas típicas de cílios primários, encontramos uma alta expressão. Mais ainda, revela-se um padrão no qual tais marcadores estão mais expressos nos clusters cuja expressão de *PRNP* é aumentada. Tendo isso em vista, a partir de matrizes de correlação da expressão gênica podemos, portanto, observar que existe uma correlação positiva entre as expressões de *PRNP* e *IFT88*, e *PRNP* e *ARL13B*. Por fim, estudamos a expressão gênica dos fatores transcrição associados a ciliogênese e vimos alta expressão nos clusters com altos níveis de *PRNP*.

Conclusão

Os dados reforçam, através da utilização de um dataset robusto de dados de *scRNA-seq*, a hipótese de que PrP^C possui um papel na ciliogênese ou na sinalização via cílio primário no GBM.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

HYPERGLYCEMIA AND CELLULAR SENESCENCE: EFFECTS OF SUPPLEMENTATION WITH VITAMINS C AND E

Kertesz, D. S. L., Moraes, G. M., Santos, M. F., Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introduction and Objectives: Diabetes Mellitus (DM) is a chronic disease that causes several complications and has negative impacts on the quality of life of individuals. Among the main risk factors for the development of the disease, aging and obesity stand out, which are associated with cellular senescence. Cellular senescence is an irreversible process of arrest in the cell cycle, in which the cell does not die by apoptosis and undergoes a series of morphofunctional transformations that interfere with tissue homeostasis. One of the possible causes of cellular senescence is oxidative stress, which results from the imbalance between the excessive production of reactive oxygen species and the ability of the antioxidant defense systems to neutralize them. Oxidative stress can be triggered by several factors, including hyperglycemia. In order to evaluate cellular senescence under normoglycemic and hyperglycemic conditions, as well as the effect of vitamins C and E on this process, this study evaluated the expression of the potential senescence markers: senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal), lipofuscin and Ki67 (a marker of cellular proliferation). **Methods and Results:** for this purpose, experiments were performed with human dermal fibroblasts cultured for 7 days in medium with physiological or high glucose concentrations, supplemented with vitamins C and E; the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) was also employed as a reference group. In addition, dermal fibroblasts from normoglycemic and diabetic rats previously subjected to intraperitoneal treatment with the same vitamins were cultured. The results showed that in murine fibroblasts under normoglycemic conditions, vitamins can reduce SA- β -gal activity. However, the same result was not observed under hyperglycemic conditions. In human dermal fibroblasts, exposure to high glucose did not affect SA- β -gal activity, while NAC treatment increased this activity, suggesting a potential modulation of SA- β -gal activity by reactive oxygen species, not necessarily linked to senescence. On the other hand, lipofuscin (a nonspecific marker related to lysosomal activity) and Ki67 staining demonstrated that a high glucose concentration can induce senescence, with an increase of lipofuscin⁺Ki67⁺ cells. **Conclusion:** high glucose may induce cellular senescence in fibroblasts, what needs confirmation from other senescence-related markers. The activity of SA- β -gal, however, may be modulated by reactive oxygen species independently of the senescent condition. **Financial Support:** FAPESP, CAPES, CNPQ.

Fuziwara^{1,2}, C.S., Drumond¹, M.E.P., Menezes¹, M.M., Xue², B., He², L., Kimura¹, E.T.

¹Department of Cell and Development Biology. Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo.

²Molecular and Cellular Biology Department, University of California Berkeley, USA

A regulatory loop between Gata5/Foxa2/miR-200 and EZH2/PRC2 controls EMT in lung cancer metastasis

Introduction: Lung cancer is the most lethal type of cancer. Part of this lethality is due to late diagnosis when more than 60% of cases present distant metastases at bones, brain and liver, leading to an overall survival of less than 5%. Thus, investigating the biology of metastatic process is mandatory as a public health policy. One molecular mechanism involved in lung cancer progression is the repression of miR-200 family of miRNAs that regulate the epithelial-mesenchymal transition (EMT). Our previous study showed that miR-200 deletion accelerated the formation of lung adenocarcinoma and progression in KP transgenic mice model. **Objective:** Investigate the transcriptional regulation of miR-200 cluster and its impact in lung cancer metastasis. **Methods:** For in silico analysis of promoter region, we used the FANTOM 5, genome browser and transcription factor (TF) prediction tools. We cloned several fragments of miR-200c/141 and miR-200b/miR-200a/miR-429 into the luciferase reporter plasmid pGL4-20, and transfected into a panel of murine lung cancer cell lines (metastatic: 889PF, 404M1 and KPT4-LM and non-metastatic: 368T1, 394T4 and KPT4). Gene expression analysis of TFs and miR-200s was performed for comparisons among lung cancer lines, including. For overexpression experiments, we cloned the coding sequence of TFs (Gata5 and Foxa2) into MSCV-puro plasmid and transfected into metastatic lines 889PF and 404M1. Modulation of Ezh2 was performed with CRISPR/Cas9 in 889PF cells. **Results:** we defined the minimal promoter region of miR-200c/141 and miR-200b/miR-200a/miR-429 as the fragments -1246 to 0bp and -4363 to -4027bp from transcription start site, respectively. In silico search for TFs revealed a list of several TFs related to lung biology, such as Nkx2-1, Gata5 and Foxa2. Gene expression analysis showed that reduced levels of miR-200s expression in metastatic lines (889PF and 404M1) inversely correlated with TFs Gata5 and Foxa2 levels. The reactivation of Gata5 and Foxa2 in the metastatic lines reverted the mesenchymal phenotype to an epithelial phenotype while restored miR-200s expression and blocked EMT factors. Further investigation of Gata5 and Foxa2 genes promoter region revealed a common signature for polycomb gene Ezh2/PRC2. Overexpression of Ezh2 in non-metastatic cancer lines reduced TFs and miR-200 expression. Moreover, KPT4-LM, another metastatic line, showed activation of EMT and reduction of miR-200s and TFs, while Ezh2 and PRC2 components were upregulated. Ezh2 gene editing in 889PF resulted in mesenchymal phenotype. **Conclusion:** mesenchymal phenotype is controlled by the loop between EZH2/PRC2 and TFs Gata5-Foxa2/miR-200s. Moreover, Gata5 and Foxa2 are pioneer TFs that can restore epithelial phenotype in lung cancer metastatic cell lines.

Financial support: FAPESP and CNPq.

EFEITO DOS “EXERCISE SNACKS” NA EXPRESSÃO DE ADIPOCINAS E MIOCINAS EM CAMUNDONGOS: UMA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE E CURTA DURAÇÃO

ROCHA, L.; RICCARDI, J. H. S.; ROSA NETO, J. C.

Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

Introdução e Objetivos: O sedentarismo, caracterizado pela baixa atividade física, é uma condição cada vez mais comum e é frequentemente associada a várias doenças crônicas, incluindo diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, câncer e depressão. Estudos demonstram que a promoção da atividade física pode melhorar a saúde geral, reduzindo a inflamação e melhorando a resposta imunológica. Os "exercise snacks" são sessões curtas e rápidas de atividade física realizadas ao longo do dia, que podem ser facilmente incorporadas na rotina diária. Evidências sugerem que esses exercícios podem melhorar a saúde cardiometabólica e reduzir os riscos associados ao sedentarismo. Este estudo visa investigar os efeitos moleculares das miocinas liberadas pela prática de exercícios físicos de alta intensidade e curta duração, conhecidos como "exercise snacks". O objetivo é analisar os efeitos agudos durante um único dia e os efeitos crônicos ao longo de várias semanas de exercício em camundongos, focando na expressão gênica e proteica. Espera-se que os resultados confirmem os benefícios fisiológicos observados na literatura e demonstrem o potencial dos "exercise snacks" na melhora da saúde geral e na prevenção de doenças crônicas. **Métodos e Resultados:** O protocolo incluiu um teste máximo em esteira para determinar a velocidade máxima, seguido de quatro semanas de sessões de treino diárias de 60 segundos a 80% da velocidade máxima, realizados quatro vezes por semana, nos horários de 9h, 12h, 14h e 17h. Após a última sessão, os camundongos foram eutanasiados para coleta de músculos (sóleo, tibial anterior, gastrocnemius), tecidos adiposos e sangue para análise da expressão gênica e proteica através de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) quantificando Adiponectina, Leptina, IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α . O grupo que realizou o protocolo de "exercise snacks" não apresentou melhora significativa na velocidade máxima no teste de esteira rolante pré e pós-treino. No entanto, houve uma redução no ganho de peso tanto nos machos quanto nas fêmeas após 30 dias de treino. Além disso, foi observada uma modulação das miocinas e adipocinas devido ao protocolo de treino, indicando uma resposta metabólica e inflamatória positiva aos "exercise snacks". **Conclusão:** Portanto os resultados obtidos nesse projeto indicando que este protocolo de exercício deve ser mais estudado para entendermos os mecanismos que podem estar associados ao efeito positivo do exercise snacks, evidenciando o potencial dos "exercise snacks" para melhorar a saúde geral e prevenir doenças crônicas associadas ao sedentarismo.

Apoio Financeiro: FAPESP, PIBIC/CNPq

CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS ENDOMETRIAIS PARA ESTUDOS DE COCULTIVO 3D: AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

LEÃO, M.A., BEVILACQUA, E.M.

Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento Instituto de Ciências
Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos

A implantação embrionária é um processo crucial para a reprodução humana, ocorrendo quando o blastocisto se adere ao endométrio para iniciar a placentação. Dada a importância dessa etapa para o desenvolvimento, sistemas *in vitro* de cultivo celular têm sido elaborados para entender esse processo e investigar falhas na implantação. Entretanto com os vários elementos envolvidos no processo *in vivo* como o trofoblasto, células endometriais epiteliais e estromais, células endoteliais dos vasos uterinos, além das células do sistema imunológico, a criação de um modelo de cocultivo 3D com esses componentes é essencial para estudar os mecanismos fisiológicos da reprodução. Este estudo visa padronizar a técnica de imunohistoquímica para a caracterização de células epiteliais uterinas obtidas a partir de fragmentos de biópsias endometriais, para avaliação do modelo de cocultivo 3D que busca elucidar os mecanismos fisiológicos uterinos durante a implantação.

Métodos e Resultados

Foram utilizadas células epiteliais provindas de frações de biópsias endometriais de pacientes em tratamento para fertilização *in vitro*. A metodologia escolhida para a avaliação proposta no trabalho foi a técnica de imunohistoquímica para caracterização das células com anticorpos primários anti-glicodelina (*Sigma-Aldrich. HPA020108 Rabbit Anti-PAEP*) e anti-citoqueratina (*Novus. NB600579/583 Rabbit Anti-CK*) empregados em reações indiretas com anticorpos secundários (*Sigma-Aldrich. A8275 Anti-Rabbit IgG*) conjugados à peroxidase, a revelação foi realizada utilizando-se o kit Sigma Fast-DAB (No. D9292). As amostras foram tratadas para recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase endógena, além de terem sido criados controles negativos. Os materiais preparados satisfatoriamente mostraram marcação positiva para citoqueratina e glicodelina, com a eficácia do bloqueio de peroxidase endógena sendo aprimorada com o uso de peróxido de hidrogênio em 25% metanol. O protocolo foi otimizado a fim de reduzir a marcação inespecífica.

Conclusão

A técnica de imunoperoxidase demonstrou ser eficaz na caracterização das células epiteliais uterinas, com a padronização bem-sucedida dos métodos de bloqueio e recuperação antigênica. Os resultados obtidos evidenciam a eficácia do modelo de cocultivo desenvolvido, permitindo uma análise detalhada das células isoladas. Isso é fundamental para garantir o estudo das respostas e interações celulares no tecido, contribuindo para a compreensão dos fenômenos associados a potenciais falhas na implantação embrionária.

O projeto contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE DE CISALHAMENTO NA ADESÃO TUMOR-ENDOTÉLIO DURANTE A METÁSTASE

Tsukioka, G.H. [1], Villarinho, N.J. [1], Najophe, S. [1], Freitas, V.M. [1]

[1] Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Introdução e Objetivos

Células endoteliais (CEs) são células que revestem os vasos sanguíneos e, durante a tumorigênese, apresentam mudanças em seu comportamento durante processos como angiogênese e metástase. Os estudos que utilizam culturas de CEs como modelo podem não representar as condições reais dessas células, pois essas são continuamente expostas ao *flow shear-stress (FSS)*, que é a fricção causada pelo fluxo sanguíneo. Em dados recentes do grupo, observamos que o FSS altera tanto a morfologia de células endoteliais da veia de cordão umbilical humano (HUVECs) quanto seu perfil proteico, levando a superexpressão da proteína HMGA2 (High Mobility Group A2). Esse projeto tem como objetivo validar a expressão de HMGA2 em condições estáticas e expostas a FSS, e como essa força afeta o endotélio e o processo de intravasamento durante a metástase.

Métodos e Resultados

Para validar a expressão diferenciada de HMGA2, HUVECs foram cultivadas e submetidas a FSS em um agitador orbital. Após o alinhamento das HUVECs ao fluxo, as células foram lisadas e o foi realizado Western blotting para avaliar a expressão de HMGA2 e imunofluorescência para avaliar a localização intracelular. Como controle experimental, foram usadas células HUVEC cultivadas em fluido estático. HMGA2 está localizada no núcleo celular e, comparado ao controle estático, sua expressão proteica é aumentado em células alinhadas em resultados preliminares.

Conclusão

Os immunoblots mostraram aumento da proteína HMGA2 em células expostas ao shear stress. A imunofluorescência mostrou que a proteína HMGA2 está presente no núcleo de HUVECs em condição estática.

Apoio Financeiro: Programa Unificado de Bolsas (USP)

CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE CÉLULAS EPITELIAIS MANTÉM A EXPRESSÃO DE COLÁGENO E QUERATINA SEMELHANTES ÀS CÉLULAS DE ORIGEM

Silva, G.S., Del Debbio, C.B. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introdução e Objetivos

A retina é um tecido nervoso suscetível a estímulos degenerativos que podem levar ao desenvolvimento de doenças, como Glaucoma. Apesar da degeneração retiniana ser irreversível e incurável, algumas células epiteliais da retina de mamíferos apresentam potencial de células-tronco, com capacidade de se transformarem em células progenitoras retinianas após estímulos com fatores de crescimento e, em seguida, se diferenciarem em neurônios retinianos funcionais. Apesar da capacidade de desdiferenciação destas células, elas preservam algumas propriedades chamadas de “parentais”, ou seja, as células-tronco mantêm algumas características das células adultas de origem. Nesse trabalho, investigamos a expressão de queratina e colágeno nas células-tronco derivadas de células do Epitélio Pigmentado (EP) retiniano para avaliar se estas proteínas são preservadas durante o processo de ativação das células-tronco.

Métodos e Resultados

A expressão de colágeno 2 (Col2a1), colágeno 5 (Col5a2), colágeno 18 (Col18a1) e queratina 14 (Krt14) foi analisada nas células do EP no estado diferenciado e após sua transformação em células-tronco em cultura (neuroesferas). Foram empregadas análises morfológicas e histológicas clássicas, como Tricômico de Shorr, fucsina ácida/van Gieson, coloração de Gram e de ácido periódico-Schiff – PAS, análises de imunohistoquímica, e análises gênicas (RT-PCR). Os resultados indicaram que as neuroesferas originadas do EP apresentam a expressão dos transcritos de colágeno 2 (Col2a1), colágeno 5 (Col5a2), colágeno 18 (Col18a1) e queratina 14 (Krt14), similar às células do EP pós-natal (diferenciadas). Além disso, os experimentos de imunorreação indicaram que as células do EP expressaram fortemente citoqueratinas e não expressaram colágeno 1.

Conclusão

Nossos dados indicam que, apesar de serem reprogramadas em células-tronco, estas células progenitoras continuam expressando algumas características de células epiteliais, sugerindo que estas características sejam importantes para algumas funções da célula-tronco, ou que o mecanismo de expressão destes fatores não pode ser reprogramado quando a célula assume a identidade de célula-tronco.

Apoio Financeiro

FAPESP e USP (PUB).

O PAPEL DE PRP^C E SUA DINÂMICA NO TRÁFEGO DE CD44 EM CÉLULAS-TRONCO DE GLIOBLASTOMA

Nunes, R.A., Prado, M.B., Souza, M.C.S., Coelho, B.P., Lopes, M.H. Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introdução e Objetivos

Glioblastoma (GBM) é o tipo mais agressivo dentre os tumores de cérebro, possuindo uma sobrevida de 1 a 2 anos e uma alta taxa de recorrência. Por ser um tumor heterogêneo, nosso foco é nas células-tronco de glioblastoma (CTGs), uma subpopulação que orquestra a biologia tumoral, assim como nas principais proteínas envolvidas nos processos de manutenção, proliferação e invasão tumoral. Dentre a gama de proteínas sobressai PrP^C, uma glicoproteína GPI-ancorada presente em microdomínios de membrana onde pode atuar como uma proteína *scaffold*, recrutando ligantes envolvidos na transdução de sinais intracelulares. Um dos ligantes da proteína prion e também alvo de estudo é CD44, um biomarcador de *stemness* superexpresso nas CTGs envolvido com os processos de motilidade e migração celulares e também fundamental para a biologia do GBM. Dados previamente gerados pelo grupo indicam que CD44 se encontra em microdomínios de membrana co-localizando com PrP^C, o que sugere uma possível interação entre essas moléculas. Assim, visto que ambas as proteínas de interesse estão envolvidas na biologia das CTGs, este trabalho tem como objetivo avaliar o papel de PrP^C no processamento e tráfego celular de CD44 em CTGs.

Métodos e Resultados

Inicialmente, foram realizados ensaios de dot blot, pull-down e co-imunoprecipitação para verificar a interação entre ambas as proteínas *in vitro* e no contexto celular. Ainda, ensaios de imunofluorescência, qPCR e *Western blotting* foram realizados para avaliação da expressão e localização de CD44 assim como de biomarcadores de tráfego celular utilizando diferentes populações de GBM com expressão diferenciada para PrP^C e CD44^C. Nossos achados comprovaram a interação entre CD44 e PrP^C *in vitro*, nas quais CD44 parece ter um papel na expressão de PrP^C. Além disso, PrP^C aparenta modular não só a expressão de biomarcadores da via endocítica como EEA1, CD71, LAMP1 e RAB11 como também o endereçamento de CD44 em CTGs, visto que na ausência de PrP^C há um evidente acúmulo intracelular de CD44 cujo mecanismo provavelmente está ligado à uma perturbação em sua via de reciclagem ou de degradação. Por fim, experimentos recentes indicam que a proteína prion é essencial para uma das vias de internalização de CD44 (a via dependente de cobre).

Conclusão

Vista a influência de PrP^C sobre algumas proteínas-chave da biologia de GBM como CD44, a continuidade do estudo sobre seu processamento e o tráfego nas CTGs possibilitaria entender melhor a biologia do tumor e também o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos para melhorar a sobrevida e a qualidade de vida de pacientes acometidos com GBM.

Apoio Financeiro

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE STI1: EFEITOS NO STATUS DE PLURIPOTÊNCIA MEDIADOS PELA VIA DE WNT

Soares, S.R., Fernandes, C.F.L., Lopes, M.H., Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: As células-tronco embrionárias murinas (CTEm) são essenciais para a compreensão dos estágios iniciais do desenvolvimento devido à sua capacidade de se diferenciar nos três folhetos embrionários, uma característica chamada de pluripotência. Esta pluripotência ocorre durante uma breve janela, desde a formação do blastocisto até a diferenciação celular, e é amplamente regulada por uma rede de fatores de transcrição, incluindo Oct4, Sox2 e Nanog, além de circuitos secundários. A maquinaria de regulação da homeostase proteica, que inclui proteínas de choque térmico (HSPs) e seus parceiros, também desempenha um papel crucial. Neste contexto, uma co-chaperona de HSP70/90, chamada STI1/Stip1 (stress inducible phosphoprotein 1), foi descrita como um componente essencial do desenvolvimento inicial embrionário devido a seu fenótipo letal após deleção em embriões de camundongo. No entanto, o mecanismo de ação por trás desse fenótipo ainda é pouco conhecido e necessita maior caracterização. Dados da literatura em modelos tumorais, em conjunto com nossas análises de sequenciamento de RNA de CTEm, sugerem uma relação entre Stip1 e componentes-chave da sinalização canônica de Wnt a ser explorada nesse trabalho a fim de avaliar mais detalhadamente o papel desta co-chaperona no desenvolvimento inicial de mamíferos.

Métodos e Resultados: Dessa forma, utilizamos linhagens de CTEm com expressão diferencial de Stip1 em ensaios de RT-qPCR e *Western blotting* para determinar o perfil de ativação de componentes e alvos clássicos da sinalização canônica de Wnt e reguladores centrais da pluripotência. Ademais, avaliamos a distribuição celular e a co-localização da efetora β -catenina com Stip1 via imunofluorescência. Avaliamos ainda outros aspectos fenotípicos como a proliferação e morte celular por meio de curvas de crescimento e imunofluorescência em diferentes condições de cultivo celular. Nossos resultados preliminares apontaram um aumento do número de células e diminuição de marcadores de morte celular correlacionado com aumento da expressão de Stip1. Apesar de não observarmos diferenças estatísticas na distribuição e co-localização de β -catenina e Stip1, a modulação da expressão dessa co-chaperona parece estar relacionada à mudança nos níveis de ativação dessa efetora da sinalização canônica de Wnt. Ademais, nossos resultados apontaram uma redução dos alvos canônicos da β -catenina que, em conjunto com aumentos na expressão de conjuntos secundários de fatores de transcrição, podem sugerir uma ativação da via por mecanismos alternativos em resposta à modulação de Stip1.

Conclusões: Sendo assim, nossos dados iniciais apontam para importantes alterações fenotípicas em CTEs e na sinalização de Wnt que continuarão a ser explorados para melhor caracterizar a função de Stip1 no desenvolvimento inicial murino.

Apoio Financeiro: FAPESP

IDENTIFICATION OF NEW REGULATORS OF LUNG CANCER METASTASIS

Gois¹, G.A., Oliveira¹, P.L.S., Menezes¹, J.M., de Mello¹, D.C., Kimura¹, E.T., Fuziwara¹, C.S., Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Background and Aims: Lung adenocarcinoma is one of the most prevalent human cancers. More than 50% of patients present metastasis at diagnosis, and this contributes to the rapid disease progression and high rate of lethality. Thus, understanding the biology of metastasis is essential for the development of new treatment approaches. In this context, we previously identified that the down-regulation of miRNA miR-200c accelerated metastasis development in a murine model of lung adenocarcinoma (KP mouse), and that miR-200 transcription is regulated by lung transcription factors (TFs) such as Gata5 and Foxa2. The aim of the project was identify new transcription factors involved in the regulation of lung cancer metastasis.

Methods and Results: We used an aggressive cell line derived from a mouse liver metastasis of lung adenocarcinoma (KPT4-LM) compared with the primary adenocarcinoma line (KPT4) for transcriptomic analysis by RNA sequencing. The RNAseq analysis was performed by a bioinformatician to generate a table of differentially expressed genes (log fold-change +/-1). In order to identify new genes that control lung differentiation, we focused on the down-regulated genes, specifically in transcription factors. Gene expression analysis of TFs and miR-200s was performed using qPCR. For overexpression experiments, we cloned the coding sequence of TFs (Gata4 and Hnf4a) into MSCV-puro plasmid. The analysis of RNAseq revealed 1429 down-regulated genes (<log2fold change -1), among which we identified the TFs Gata4 (log2fold change=-2,06), Gata5 (log2fold change=-6,48), Cdx2 (log2fold change=-2,26), Nkx2-1 (log2fold change=-6,41), Nkx2-3 (log2fold change=-1,71), Hnf4a (log2fold change=-8,49). All these TFs are potential regulators of miR-200 expression using a in silico search for miR-200c promoter region. Thus, we decided to clone Gata4 and Hnf4a coding sequences to evaluate if their overexpression could block the epithelial-mesenchymal transition process such as we observed for Gata5 and Foxa2, previously. We are currently in the process of cloning Gata4 and Hnf4a cDNA.

Conclusion: The transcriptomic analysis of the liver metastasis cell line KLM reveals downregulation of several TF, among which new transcription factors that could potentially regulate the metastasis biology.

Financial support: FAPESP and CNPq

**EXPRESSÃO DE RUNX1 E SUA MODULAÇÃO POR BMPs DURANTE A DIFERENCIAÇÃO
SENSORIAL DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL EM EMBRIÕES DE GALINHA**

NETO, N.M.; IKESAKI, S.M.; YAN, C.Y.I.; LABORATÓRIO DE EMBRIOLOGIA MOLECULAR DE
VERTEBRADOS DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO;
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - USP
nelsonmunhozneto@usp.br

Introdução e Objetivos

Os gânglios da raiz dorsal (GRDs) são estruturas do sistema nervoso periférico que abrigam os corpos celulares dos neurônios relativos à percepção sensorial (mecanocepção, propriocepção e nocicepção). Essas estruturas são formadas pela migração, proliferação e diferenciação das células da crista neural. Dados prévios do laboratório demonstraram atividade das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) nos gânglios da raiz dorsal em estágios iniciais do seu desenvolvimento. As BMPs são essenciais para o neurodesenvolvimento enquanto os fatores de transcrição Runx1 são determinantes para a definição de linhagens neuronais nociceptivas nos GRDs. Em linhas gerais, visamos correlacionar o padrão espacial e temporal de expressão de Runx1 com a atividade da via de BMP ao longo do desenvolvimento dos GRDs para avaliar a importância da sinalização BMP como possível moduladora da expressão de Runx1 e, conseqüentemente, da diferenciação sensorial dessas estruturas. Primeiramente, demonstramos a evolução da sinalização BMP durante o desenvolvimento do GRD.

Métodos e resultados

Para isso, eletroporamos um plasmídeo sensível a atividade BMP em GRD embrionários. Na presença de níveis suficientes de sinalização BMP, o plasmídeo transcreve GFP (Green Fluorescent Protein). Ou seja, visualizamos a presença da sinalização BMP através da detecção por microscopia de fluorescência da proteína GFP. Assim como esperado, BMPs não apresentam atividade intensa na porção ventral dos GRDs, o que condiz com o gradiente de concentração dorso-ventral já descrito na literatura. Ademais, notou-se marcação na porção do funículo dorsal da medula espinhal embrionária, provavelmente denotando o ingresso de axônios sensoriais na corno dorsal. Juntos, eles mostram que a atividade de BMPs parece se manter durante as primeiras etapas de formação dos gânglios da raiz dorsal.

Conclusão

Tendo em vista a atividade das proteínas morfogenéticas ósseas nos gânglios da raiz dorsal em diferentes estágios, ressalta-se a possibilidade desta proteína regular a expressão de outras moléculas, como o fator de transcrição Runx1, modulando, conseqüentemente, a diferenciação sensorial nos GRDs.

Apoio Financeiro FAPESP 2024/07327-0

REGULAÇÃO DO SPLICING ALTERNATIVO DO GENE *MIR17HG*. Munhoz, V.M., Coltri, P.P., Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

Introdução e objetivos. Em células eucarióticas, os genes são transcritos como precursores de RNA mensageiro (pré-mRNA). Constituídos por *exons*, segmentos que serão mantidos no mRNA maduro, intercalados por segmentos intermediários, denominados *introns*, os pré-mRNAs são submetidos a um processamento denominado *splicing*, no qual o spliceossomo catalisa a remoção dos *introns* e a junção dos *exons*, permitindo a formação de transcritos maduros funcionais (mRNAs). Algumas proteínas, como as proteínas heterogêneas nucleares (hnRNPs), podem interferir na seleção dos sítios de *splicing* presentes em pré-mRNAs e, desta forma, modular a eficiência do processo. A associação de determinadas hnRNPs à transcritos contendo microRNAs (miRNAs) em *introns* já foi constatada, sugerindo o envolvimento destas com o *splicing*. No genoma humano, cerca de 70% dos miRNAs estão localizados nos *introns* e, deste modo, é possível que o processo de *splicing* seja importante para sua biogênese. A superexpressão do cluster policistrônico *miR-17-92*, também conhecido como oncomiR-1, foi observada em diferentes tipos de câncer, como por exemplo, em câncer de mama, tireoide e pâncreas. Resultados prévios obtidos por nosso grupo de pesquisa identificaram a associação de hnRNP K e hnRNP M aos miRNAs *miR-18a* e *miR-19a* e demonstraram a importância de hnRNP A1 para a maturação de *miR-18a*. Deste modo, a hipótese deste projeto é que as proteínas hnRNP A1, hnRNP K e hnRNP M podem mediar a regulação do *splicing* do gene *MIR17HG* e a interação dos transcritos com o spliceossomo e com o microprocessador, interferindo no processamento e biogênese dos miRNAs do cluster *miR-17-92*. Sendo assim, têm-se como objetivo investigar a associação destas proteínas com os transcritos de *MIR17HG* e com os miRNAs do cluster *miR-17-92*, bem como, com o spliceossomo e o microprocessador.

Métodos e resultados. Com intuito de superexpressar as proteínas hnRNP A1 e hnRNP K, foram transfectados os vetores pFLAG+ hnRNP A1 e pFLAG+hnRNP K em células HEK-293T. Após confirmação da superexpressão, os cDNAs foram utilizados em experimentos de RT-PCR e RT-qPCR visando a análise do perfil de *splicing* do gene *MIR17HG*, bem como dos marcadores *BCL2L1* e *CD44*. Com base na comparação dos transcritos de *MIR17HG*, foi observado que células superexpressando hnRNP A1 apresentam maior expressão da isoforma que contém o cluster *miR-17-92*. Além disso, os dados obtidos sugerem que a superexpressão de hnRNP A1 interfere no perfil de *splicing* do gene *BCL2L1*, impactando na produção das isoformas pró e anti-apoptóticas.

Conclusões. Os resultados obtidos até o momento sugerem que as proteínas hnRNPs podem interferir no perfil de *splicing* dos genes *MIR17HG* e *BCL2L1*, modulando o desenvolvimento de patologias.

Apoio financeiro. CAPES, FAPESP e CNPq.

DESVENDANDO O PAPEL DA PROTEÍNA STIP1 NO NEURODESENVOLVIMENTO UTILIZANDO PLATAFORMAS 3D PARA MODELAGEM DO AUTISMO

Fernandes, C. F. L., Souza, M. C. S., Papes, F., Prado, M., Passos-Bueno, M.R.*, Lopes, M. H.*

Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (ICB – USP)

Introdução e Objetivos: O Transtorno do Espectro Autista (TEA) é uma condição de neurodesenvolvimento caracterizada por dificuldades na interação social, déficits de comunicação e comportamentos estereotipados. A etiologia do TEA é complexa e envolve uma interação de fatores genéticos, epigenéticos, metabólicos, imunológicos e ambientais. Dada essa heterogeneidade, o diagnóstico e tratamento do TEA são desafiadores, ressaltando a necessidade de identificar biomarcadores e aprofundar a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao transtorno. O TEA relacionado a autoanticorpos maternos (MAR-ASD) envolve autoanticorpos maternos (MAU^{Abs}) que têm como alvo o tecido cerebral do feto em desenvolvimento. Entre esses autoanticorpos, destacam-se aqueles contra a *Stress-inducible Phosphoprotein 1* (STIP1), que estão associados a formas mais graves de TEA. O impacto dos MAU^{Abs} no neurodesenvolvimento humano ainda permanece pouco explorado. A STIP1 desempenha um papel crítico no neurodesenvolvimento através de sua interação com a proteína príon celular (*PRNP/PrP^C*). Este complexo é essencial para a neurogênese, proteção neuronal e formação da memória. A deleção de STIP1 em camundongos resulta em letalidade embrionária precoce e na degeneração do tubo neural. No entanto, os efeitos específicos da redução de STIP1 no neurodesenvolvimento humano e sua interação com autoanticorpos maternos no TEA ainda não são bem compreendidos. Neste trabalho, investigamos as funções da STIP1 no neurodesenvolvimento e os efeitos dos MAU^{Abs} em modelos humanos. **Métodos e Resultados:** Esses aspectos serão investigados utilizando abordagens *in silico* e modelos tridimensionais para o neurodesenvolvimento humano. Resultados preliminares indicam expressão aumentada de *STIP1* e *PRNP* em dados de *single-cell RNA sequencing* do cérebro de camundongos. Ainda, a expressão de STIP1 é alterada com o processo de neurodiferenciação de células de pluripotência induzida humanas. Adicionalmente, STIP1 correlaciona-se positivamente com genes associados a processos fundamentais do neurodesenvolvimento humano, como formação primária do tubo neural e o fechamento do tubo neural. Através da padronização e caracterização de organoides cerebrais, obtemos um modelo tridimensional do desenvolvimento cerebral humano que será

ulizado em futuras investigações. **Conclusão:** Através deste projeto, elucidaremos as vias moleculares moduladas pela STIP1 e seus parceiros no contexto do MAR-ASD, fornecendo *insights* sobre os mecanismos moleculares subjacentes ao TEA, além de potenciais biomarcadores e alvos terapêuticos para esse transtorno. **Apoio Financeiro:** INCT Model 3D do CNPq. Projeto No. 153574/2024-0

DISCOVERY OF NOVEL ANIMAL-FREE DERIVED-EXTRACELLULAR MATRICES FOR 3D SCAFFOLD DESIGN FOR DEVELOPMENT OF MAMMARY GLAND SPHEROIDS

Saavedra-Plazas, D. C. ⁽¹⁾, Alves, L. ⁽²⁾, Nosedá, M. ⁽²⁾, Maniglia, B. ⁽³⁾, Backes, E. ⁽⁴⁾, Porcionatto, M. ⁽⁵⁾, Juliano, M.P. ⁽⁶⁾, Freitas, V. M. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Dept. of Cell and Developmental Biology, ICB, USP

⁽²⁾ Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, UFPR

⁽³⁾ Chemistry Institute of São Carlos, USP

⁽⁴⁾ Dept. of Materials Engineering, UFSC

⁽⁵⁾ Dept. of Biochemistry, UNIFESP

⁽⁶⁾ Dept. Biophysics, UNIFESP

Introduction and Objective

In vitro models mimic natural tissue physiology using 3D structures made from extracellular matrix (ECM) materials, including tumor ECM. Driven by new animal welfare regulations, the market seeks novel biomaterials. Mimicking natural ECM is challenging due to its impact on cell organization and adhesion. Key questions include: How can we stimulate cell organization and facilitate effective signaling between cells and ECM? New materials often lack defined analysis techniques, requiring new methodologies. Our goal is to explore cost-effective materials for creating a microenvironment that mimics mammary gland tissue.

Methodology and Results

This research addresses three main areas: the structure of starch scaffolds, the chemical modification of polysaccharides, and the use of synthetic peptides to enhance cell adhesion in vitro.

Starch scaffolds were optimized by determining the ideal chitosan concentration (high and low molecular weights) and testing drying conditions (80°C and freeze-drying). The optimal combination was 1% high molecular weight chitosan and 99% starch, dried at 80°C.

The polysaccharide was modified with methyl methacrylate groups for UV crosslinking, resulting in a hydrogel. FTIR confirmed the modification with a peak at 1724 cm⁻¹. The polysaccharide was mixed with alginate (50%/50%-v/v), and a viability test using DAPI and propidium iodide in an IBIDI slide (10 µL per well) over 72 hours showed 72% viability.

Additionally, 17 peptides were synthesized using Fmoc, of which 9 enhanced MDA MB 231 cell adhesion, as measured by a colorimetric assay at 600 nm after 45 minutes.

Conclusions

Starch and starch/chitosan scaffolds showed low degradation in vitro, which may change with cell contact. The next step is to test these materials with cells and use histology techniques, as their opacity hinders cell observation in vitro. For hydrogel, staining with propidium iodide and DAPI has been the most effective for comparing cell viability. The optimal mixture was 50% alginate and 50% polysaccharide, but further optimization is needed by testing three stiffness levels and analyzing their effects on cells. To enhance these biomaterials, peptides will be incorporated, requiring chemical analyses (NMR) and a procedure to link peptides to starch and polysaccharide structures.

INVESTIGATION OF THE MODULATORY ROLE OF AHNAK IN THE INTERACTION OF BREAST CANCER EXTRACELLULAR VESICLES WITH BRAIN ENDOTHELIUM

Hiroki, C.T., Yamagata, A.S., Teles, R.G., Freitas, V.M., Departamento de Biologia celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction and aims. Extracellular vesicles (EV) from cancer cells modulate the progression of mammary carcinomas, aiding in metastasis formation. In the brain, due to the presence of the blood-brain barrier, the extravasation of circulating tumor cells is still poorly understood. Encapsulated within EV, AHNAK exhibits differential expression in breast cancer and is associated with metastasis. The aim of this study is to investigate the association between differential expression of AHNAK and morphological and behavioral changes in breast carcinoma cells and also determine the effect of extracellular vesicles with modulated levels of AHNAK in brain endothelial cells (hCMEC/D3). **Methods and results.** EV were isolated from MDA-MB-231, MDA-MB-231-BR, MCF-7 and MCF-7 with AHNAK overexpression. AHNAK quantity in carcinoma cells and its EV was evaluated by Western Blot (WB). The EV were used for the treatment of hCMEC/D3 cells to evaluate changes in their protein content by WB and their metabolism by MTT assay. To evaluate whether the differential expression of AHNAK alters cellular behavior a shear stress assay was conducted, in which cells were exposed to conditions resembling those encountered in the circulation. The adhesion of MCF-7 and MCF-7 AHNAK to hCMEC/D3 cells and migration was assessed by immunofluorescence and wound healing assay, respectively. The height and elasticity of breast cancer cells was evaluated by atomic force microscopy analysis. The results show that breast cancer cell lineages and its EV exhibit varying levels of AHNAK. MCF-7 cells with AHNAK overexpression show higher survival rate and adhesion, in addition to presenting greater membrane rigidity and height. Finally, Breast cancer EV may alter the expression of AHNAK, VWF and VE-Cadherin in hCMEC/D3. **Conclusion.** Results indicate that AHNAK and EV have a potential role in modulating tumoral behavior and breast cancer progression.

Funding: PIBIC CNPq

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

NON-TOXIC CONCENTRATIONS OF SULFORAPHANE FOR NEURAL PROGENITOR CELLS. Menezes, I. O.; Andreotti, D. Z.; Lima, L. S.; Kawamoto, E. M. Pharmacology Department, Institute of Biomedical Science (ICB), University of São Paulo (USP); São Paulo, Brazil.

Introduction and Objectives: Neural progenitor cells have the capacity for renewal and differentiation into important cell types in the recomposition of brain tissue. In that context, cell exposure to sub-toxic concentrations of some substances can induce an adaptive cellular response to insults. Sulforaphane (SF) is an antioxidant isothiocyanate derived from cruciferous vegetables with the potential to stimulate cell proliferation. Analyze the potential of SF to act on the proliferation and viability of progenitor cells.

Methods and Results: MTT (viability), LDH (cytotoxicity), and proliferation (number and diameter of neurospheres) assays were carried out on neural progenitor cells from the hippocampus of C57BL-6 mice up to 4 days old (CEUA 3952300622), treated with concentrations of SF (0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 and 15 μ M). The analyses happened at different times after treatment: 24 and 48 hours for viability and cytotoxicity, and up to 3 days after treatment for proliferation. We found out, by LDH, that the cytotoxicity was increased by the 10 μ M treatment (24h) and 1, 2, 5, and 15 μ M (48h). About the MTT test, only the 15 μ M treatment (24h) had a decreased viability. Finally, The number of neurospheres was lower in the 5 to 15 μ M treatment (2 and 3 days) and the neurosphere's size was smaller in the 1 to 15 μ M treatment (1, 2, and 3 days). Therefore, the most consistent result observed is that 0.25 and 0.5 μ M concentrations were the only ones that did not significantly interfere with the cytotoxicity (LDH) or viability (MTT) of the cells after 24h and 48h, nor did they reduce the number and diameter of the neurospheres. In a visual analysis, it can be seen that the cells exposed to concentrations between 0.25 and 2 μ M retain a healthy appearance, unlike the concentrations of 5 to 15 μ M which show clusters with a necrotic appearance.

Conclusions: Our findings suggest that SF in low concentrations (0.25 and 0.5 μ M) is more suitable for treatment as it does not induce cell toxicity (viability and cytotoxicity tests).

Financial support: Fapesp, CNPQ, Capes.

A molecular and electrophysiological characterization of in vitro model for CORT-dependent neuronal activation

Authors: Shigeo-De-Almeida, A. , Abdulkader, F. R. M. , Munhoz, C. D.

Introduction: Stress-related hormones such as glucocorticoids (GC) mediate behavioral adaptations and neuroplasticity. Also, increased neuronal activation (neuroplasticity) is essential for neuronal placement in stress or fear-related engrams. To understand how neuronal excitability and activation can be modulated by corticosterone (CORT; the murine GC), we used phospho-CREB expression as a marker for neuronal activation to address whether time-dependent exposure to CORT and CREB activation are correlated and how this could affect different electrophysiological parameters also associated with neuronal activation

Aim: To analyze how the corticosterone signaling pathway can affect primary neurons' molecular and electrophysiological parameters

Methods: Neuronal primary cultures from Wistar rat hippocampi (P2-P4) were maintained in 24-well plates or 35mm dishes using media compositions for neurons. Corticosterone (CORT) treatment occurred at two time intervals (15 min. to 1 hour or 2 to 4 hours). Immunofluorescence for phospho-CREB and MAP2 was performed. Voltage-dependent currents were assessed using three protocols: (I) "I-V no leak," (II) "I-V" with leak current subtraction, and (III) "H-infinity" for sodium channel inactivation. Tyrode solution perfused the cells, and patch-clamp data were acquired using HEKA EPC7 amplifiers and WINWCP v5.7.2.

Results: Based on CREB phosphorylation, CORT exposure (10uM) for 15 to 60 minutes activated more neurons (mean=0.70; std-deviation=0.17) than 2 to 4-hour treatments (mean=0.36; std-deviation=0.266; paired t-test: $t=2.709$; $p=0.013$; $N=10$). The preliminary tests are qualitative. In the "I-V no leak" protocol, positive currents peaked at 0-10 mV (556-668 pA), and negative currents peaked at -50 to -30 mV (-849 to -603 pA). After subtracting leak potassium channel interference, the "I-V" protocol revealed a peak positive current at -10 mV (297 pA) and a peak negative i_7 at -30 mV (-400 pA). The "H-infinity" protocol, studying voltage-dependent Na⁺ channel inactivation, showed Na⁺ channels remained active with pre-pulses between -80 and -50 mV (sodium currents between -411 pA and -100 pA).

Conclusions: Our preliminary results indicate that short-term CORT exposure (under 60 min.) increases hippocampal primary neurons' activation more than the long-term exposure (2 to 4h). We aim to increase the sensitivity of this test by running a CORT time-course curve. The primary neurons showed voltage-dependent electrical activity as evaluated in 3 distinct protocols that are consistent with sodium (negative) and potassium (positive) currents. Finally, prospective experiments using GR-dependent SK2 channels will allow us to use this model to better understand the role of corticosterone and GR in activating neurons.

Financial Support: FAPESP (21/12488-4; 19-00908-9; 21/04077-4), CAPES, CNPq.

Increased NADPH oxidase serves as a prognosis predictor for metastatic melanoma patients. STC, Lopes¹; MFS, Silva¹; JCL, Silva¹; AN, Mota¹; JA, Machado-Neto¹; LR, Lopes¹. Pharmacology Dpt, Biomedical Sciences Institute—USP.

Introduction and Goal: Cutaneous melanoma is the most aggressive form of skin cancer. Understanding ROS generation in melanoma etiology and progression is necessary for developing new therapeutic approaches. NADPH oxidase-dependent signaling pathways activated in melanoma may represent a new approach for the treatment of this disease. Herein, we investigated the expression, clinical and functional genomic impact of the NADPH oxidase (NOX) family in skin cutaneous melanoma. **Methods and Results:** We analyzed the RNA-seq data of melanoma patients deposited in the TCGA PanCancerAtlas cohort (n=443), with patients showing the primary melanoma type (n=76) and the metastatic type (n=367). Kaplan-Meier curves determined the overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) of patients with low (n=148) and high (n=295) expression of NOX2 and NOX4. We used Mantel-Cox test to compare the survival distribution of both groups. Gene Enrichment Analysis (GSEA) analysis was used to assess the biological processes positively correlated with the high and low expression of NOX2 and NOX4. The differentially expressed genes were collected in the Galaxy tool and illustrated in a heatmap and volcano plot. Gene Ontology was used to investigate the pathways and processes altered by high vs low expression of differentially expressed genes. NOX2 and NOX4 genes were highly expressed in melanoma (p<0.01). Correlogram analysis indicated a greater number of associations between the catalytic and regulatory subunits of the NOX family in cutaneous melanoma when compared to nevus. The analysis of OS indicated that the high expression of NOX2 (hazard ratio HR=0.57; p=0.0002) and NOX4 (HR=0.72; p=0.04) predicted a favorable prognosis of patients with metastatic melanoma; DFS showed a similar result for NOX2 (HR=0.55; p=0.0001) and NOX4 (HR=0.70; p=0.03). Unexpectedly, HR values revealed a protective effect of NOX2 and NOX4 genes throughout disease progression. GSEA analysis highlighted that both enzymes are positively correlated with immune system response, apoptosis and UV response (FDR<0.25; p<0.05). Gene Ontology data showed that the inflammatory response, leukocyte activation and pigmentation are suppressed in patients with low expression and increased in patients with high expression of NOX2 and NOX4 (p<0.05). **Conclusion:** Our study indicates a correlation between a higher level of NOX2 and NOX4 in metastatic melanoma patients with an improvement in the OS and DFS, which could be associated to the increase in the immune and inflammatory responses observed in these patients. Our data identifies a novel role for NOX2 and NOX4 as a prognosis predictor for a better clinical outcome in metastatic melanoma patients. **Financial support:** FAPESP n^o2013/07937-8.

CHRONIC ISOLATION STRESS INDUCES DEPRESSIVE LIKE-BEHAVIOR IN C57BL FEMALE MICE.

Covre, L. H. H., Munhoz, C.D., Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introduction and Objectives

Depressive disorders have become one of the leading causes of health and economic burden worldwide, with rising numbers, especially after the COVID-19 pandemic. Among the different findings in depression, an important aspect is the HPA axis hyperactivity with consequential glucocorticoids (GCs) secretion augmentation. It has been shown that, in chronic stress, GCs have deleterious and cytotoxic effects on the CNS, particularly the hippocampus and pre-frontal cortex. In mice models, different protocols of chronic stress are used to study depressive-like behavior and cognitive impairment, but most published studies are conducted in male animals.

Therefore, this project aims to assess weight variation, onset of depressive-like behavior, cognitive impairment, and social behavior in C57BL female mice after 28 days of social isolation.

Methodology and Results

After 7 days of arrival at the vivarium, C57BL female mice (CEUA 3979091121) were submitted to 28 days of chronic isolation stress in their home cages with free access to food and water. The weight and blood were collected on days 0, 7, 14, and 28 (n=18). On day 28, the behavioral tests started with two different series: the first, with the sucrose preference (n=5-6), novelty preference (n=6), splash (n=10), and tail suspension (n=12) tests; the second, with the T-maze (n=6) and passive avoidance (n=5) tests. After the behavioral tests, animals underwent euthanasia. The experiments were analyzed by T-test, two-way ANOVA with Tukey post-hoc test, or repeated measures two-way ANOVA.

During the 28 days of protocol, despite different initial weights (Mean=1,389±1,291 Control vs Stress, p=0,0303), the animals gained weight similarly with no group difference (F=0,5411, p=0,467). However, in the total weight variation, stressed mice showed more weight gain (Mean=-1,225±0,4704 Control vs Stress, p=0,0136). In the sucrose preference test, stressed mice showed a loss of sucrose preference compared to control mice (Mean=41,92±5,078 Control vs Stress, p<0,0001). In the social novelty test, the difference between the groups was only observed in the interaction time with the unknown animal on the second time of the test (Mean=221,8±92,3 Control vs Stress, p<0,0001). In the tail suspension test, stressed animals showed less mobility time than control mice (Mean=90,30±20,40 Control vs Stress, p=0,0002). In the splash test, stressed mice showed decreased time spent in grooming than controls

(Mean=43,31±12,77 Control vs Stress, p=0,0033). No group difference was observed in the percentage of alternation (t=1,4; p=0,1918) or the mean latency (t=0,0542; p=0,9578) of the T-maze test, but stressed mice spent more time taking the first decision in the test (Mean=-12,83±12,49 Control vs Stress, p=0,0405). In the passive avoidance test, no difference between groups was observed (t=0,2281; p=0,8253).

Conclusion

Chronically socially isolated C57BL female mice showed classical depressive-like behaviors, such as anhedonia, despair, and loss of social novelty preference, but no cognitive impairment.

Funding

This study was financed by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Neurovascular Unit: In vitro Model Characterization with primary cultures cells.
Duque, E.A.; Scavone, C.; Munhoz, C.D.; Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences – USP

Introduction: Several neurological conditions are associated with blood-brain barrier (BBB) rupture, including neurodegenerative diseases, trauma, brain tumors, stroke, and epilepsy. BBB is composed of endothelial cells, the basement membrane and neighboring cells such as pericytes and astrocytes. These cells, together with the extracellular matrix, microglia, neurons, vascular smooth muscle cells, mast cells and resident macrophages, are collectively defined as the neurovascular unit (NVU). The recent concept of the NVU aims to promote research integrating neuronal and vascular functions and the microenvironment in which they are inserted, which together work for homeostasis and proper brain functions in a dynamic system. So, models to study the BBB/UNV are crucial for understanding various CNS diseases. In vitro models have the greatest advantage of being a well-controlled microenvironment model. This study aims to implement and characterize the BBB/NVU co-culture in vitro model with inserts as a function study tool. **Methodology:** The brain primary in vitro model of BBB/NVU co-culture with Transwell® inserts is composed of brain primary cortical pericytes and microvascular endothelial cells in the upper compartment (BBB), and primary mixed cortical neurons and glial cell cultures in the bottom compartment (neighboring cells), obtained from adult (8 weeks) or newborn (P0-P4) C57bl/6 mice (CEUA – ICB 6040101121), respectively, as described previously (Ahlemeyer et al., 2005; Bernard-Patrzynski et al., 2019). The BBB cultures were maintained in DMEM High Glucose media supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS), 1 ng/ml bFGF, 100 µg/ml heparin, 1.4 µM hydrocortisone, ITS supplement and 0,5% penicillin/streptomycin (P/S), while the mixed cultures were maintained in DMEM with 10% FBS, 0,5% P/S. For double immunofluorescence assays, cultures were fixed with ice-cold methanol as described previously (Piccioli et al., 2001) with antibodies related to culture phenotype (GFAP, Iba1, MAP2 and NG2/α-SMA) and BBB's ultrastructure and receptors (Claudin 5, CD31 and occludin, glycoprotein-P). The nuclei were stained with DAPI. **Results:** The BBB/UNV in vitro model with inserts is composed by 95,7±3% of microvascular endothelial cells and 2,7±0,9% of pericytes in the upper chamber. In the bottom compartment, the mixed cortical neurons and glial cell cultures is composed by 64,7±6,6 % of astrocytes, 10,7±4,3% of microglia, 10,9±2,1% of neurons and absence of oligodendrocytes. The BBB's ultrastructure was confirmed by the presence of occlusive junction proteins. **Conclusion:** The characterized BBB/UNV in vitro model with inserts is a good model to study the integrated neuronal and vascular functions and their microenvironment. **Financial support:** CNPq and FAPESP.

EVALUATION OF *SIVA1* FUNCTION IN THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF BREAST CANCER

Parducci, N.S., Carvalho, M.F.L., Oliveira, B.A., Machado-Neto, J.A., Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences - USP

Introduction and Aims: The directed effort towards the development and improvement of breast cancer treatments has already brought positive results, but is still insufficient to decrease the annual numbers of diagnoses and deaths. One of the characteristic features of cancers, in general, is the alteration in the processes of cell growth, division, and death, processes that depend on the coordinated and integrated activity of multiple genes and proteins. Estimating the recognition of cellular pathways necessary for the development of breast cancer, the aim was to conduct bioinformatics analyses to characterize correlations between the expression of the *SIVA1* gene – associated with apoptosis, migration, cytoskeletal dynamics, and epithelial-mesenchymal transition – and the prognosis of patients, as well as to describe the pathways linked to its expression. **Methods and Results:** Prognostic data were collected from the cBioPortal platform (PanCancer Atlas; n=1082). Gene expression studies were performed using IBM SPSS 20, GraphPad Prism 8, and Timer 2.0 platforms. For the investigation of molecular interactions, GSEA program was used, measuring correlations based on normalized enrichment score, false discovery rate value, and p-value. Gene expression correlations were verified using the Galaxy Analysis and ShinyGO 0.80 programs. The Heatmap was elaborated through ClusterVis. Higher levels of gene expression were found in the Metaplastic Carcinoma and Lobular Carcinoma categories (p=0.000), and in the Her2 and Basal-like subtypes (p=0.004). *SIVA1* expression was also significantly higher in breast cancer patients compared to healthy donors (p<0.001), showing no correlations with overall, progression-free, and specific survival or disease-free status in the general cohort, but affecting progression-free survival in the Lobular and Metaplastic Carcinoma cohort (p=0.04). Cellular mechanisms related to *SIVA1* activity included protein secretion, spliceosome and ribosome activity, base excision repair, activation of ROS pathways, and the main rRNA processing pathway. Protein flow alterations were induced through their involvement in lipoprotein metabolism, lipidation, and ubiquitin binding. Direct interactions with genes associated with apoptosis, the p53 pathway, and other cascades hyperactive in cancers were identified. **Conclusion:** Our findings suggest that reduced *SIVA1* expression may be associated with several processes frequently observed in tumor cells. These include the impairment of DNA repair mechanisms, disruptions in apoptotic pathways, as well as alterations in ubiquitination, protein transport, and catabolism. This study was supported by the grant #2023/11752-5, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

NEUROPROTECTIVE AND ANGIOGENESIS MECHANISMS OF G PROTEIN-COUPLED ESTROGEN RECEPTOR (GPER) IN AN IN VITRO STROKE MODEL IN FRONTAL CORTICAL MIXED CULTURE

1, P.M., Jucá, 2, E.A., Duque, 3, C.D., Munhoz

Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences – ICB/USP

Introduction and Objectives

Cerebrovascular diseases, including stroke, are major global causes of death and disability. Stroke typically involves oxygen and glucose deprivation (OGD) and inflammation, leading to neuronal apoptosis and death. The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) has gained attention in neurodegenerative disease and cancer research. Activation of GPER has been associated with revascularization in the tumor microenvironment, worsening disease prognosis. Recent studies, including ours, highlight the crucial role of glial cells in cerebral ischemia, with the G1 agonist reducing OGD-induced cell death in vitro. This study aims to uncover the neuroprotective mechanisms and signaling pathways activated by GPER, particularly in angiogenesis, within an in vitro stroke model.

Methods and Results

Primary mixed cultures from the frontal cortex of neonatal female rats (P1-P4, Wistar) were subjected to OGD using a glucose-free, sodium dithionite deoxygenating solution. GPER activity was examined by treating cells with its selective agonist (G1; 10nM) and antagonist (G15; 50nM). To evaluate the cytoprotective effects of GPER, its expression was reduced using a lentiviral vector (shRNA-GPER), followed by an LDH assay. Western blot of cell lysates was performed to examine the expression of Caspase 3, Spectrin, VEGF, and HIF1- α . VEGF expression in supernatant and cell lysates was measured using ELISA. The migratory activity of human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) was quantified using a Wound Healing Assay. Results were obtained from a minimum of 3 independent cultures, with at least 3 replicates each. Under our experimental conditions, GPER knockdown exacerbated OGD-induced cellular damage compared to the shRNA-scramble group, even in the presence of G1 in mixed cortical primary cells. Western blot analysis revealed that OGD subjected cells had high levels of Caspase 3 and VEGF, while Spectrin and HIF1- α were only increased in G1 treated groups, even after OGD. ELISA confirmed high VEGF presence in cell lysates of the OGD group and in cell supernatants of the G1-treated group after OGD. However, G1 treatment reduced the migration of HBMECs after OGD, while G15 reversed this effect.

Conclusion

Our findings suggest that GPER signaling during OGD/reperfusion is crucial for cellular protection and angiogenesis, although the mechanisms remain unclear. Notably, GPER activation appears to inhibit angiogenesis in endothelial cells, necessitating further experiments to increase sample size and explore these complex pathways more deeply.

Financial Support

This work was supported by research grants from FAPESP, CNPq, and CAPES.

Dermcidin in Sight: Targeting the Melanoma-related Protein with PLGA-encapsulated Seriniquinone and Investigating its Role with Overexpression and Knockdown

Miguel RA^{1,2}, Hirata AS¹, Serala K², Khan SF², Burmeister C², Prince S², de Jesus DFF³, Garnique AMB¹, Ishida K³, Lopes LB¹, Costa-Lotufo LV²

¹Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department of Human Biology, University of Cape Town, Cape Town, South Africa

³Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Background and objectives

Dermcidin (DCD) is a 110-aminoacid protein that can be found overexpressed in melanoma cells. This protein is uniquely targeted by the marine-derived and poor water-soluble seriniquinone (SQ), being autophagy and apoptosis the treatment outcomes. This work aimed at the encapsulation of SQ in the biocompatible poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) nanoparticles (NPs), to improve its solubility and enable its *in vivo* administration, and at generating DCD-overexpressed and DCD-silenced melanoma cell models, to further improve our comprehension about the protein role in cell survival and migration.

Methods and Results

SQ was encapsulated in PLGA NPs by a single emulsion-solvent evaporation method. Size and morphology were depicted by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM). SQ encapsulation efficiency and *in vitro* release kinetics were determined by quantification with high performance liquid chromatography. Anti-melanoma activity of encapsulated SQ was assessed upon treatment of melanoma cells (SK-MEL-28 and SK-MEL-147), followed by sulforhodamine B assay. NP cell uptake was observed during 20h by phase contrast optical microscopy. Spheroid models were generated, and NP treatments performed. Toxicity evaluation *in vivo* was conducted by treating *Galleria mellonella* larvae with SQ-loaded NPs at doses up to 80 mg/kg. SK-MEL-28 was transfected with FLAG-tagged DCD or DCD shRNA plasmids, aiming at overexpressing or knocking down DCD, respectively. Then, Western blot analysis was carried out to validate these new cell models.

DLS and SEM analysis revealed spherical NPs with 120-800 nm, and most of them displayed ~210-280 nm. Encapsulation efficiency of ~83% was obtained and only ~16% was released *in vitro* after 96h. When compared to free SQ, anti-melanoma activity of SQ-loaded NPs was preserved. We were able to observe NP uptake by cells, followed by their detachment from culture dishes in a similar manner to free SQ. After a 72 h-treatment in similar concentrations to monolayer model, SQ-loaded NPs could impair spheroid integrity, highlighting the effect of SQ in cell adhesion. No *in vivo* toxicity was observed upon nanocarriers treatment in *G. mellonella*, even in the highest dose, resulting in 95% of survival and high health indexes. Cell transfection with exogenous FLAG-tagged DCD gene could provide a 1.64-fold increase in DCD protein levels, while DCD knockdown plasmids could generate clones with lower to no DCD protein levels.

Conclusion

PLGA NPs increased SQ solubility by enabling its dispersion in aqueous-based vehicles, sustaining its release and allowing its *in vivo* administration, while maintaining its biological activity. Validated models of DCD-overexpression and DCD-knockdown melanoma cells could be obtained by cell transfection.

Financial Support

FAPESP (2023/17281-4; 2022/15832-0; 2020/09270-4; 2020/06613-8; 2018/13877-1); CNPq (404518/2021-4, 440472/2022-9) e CAPES (código de financiamento 001).

Inibidor de Protease Leucocitária Secretória Reduz Inflamação no Pulmão e no Intestino na vigência da Síndrome de Desconforto Respiratório Agudo em Modelo Murino

Santos, A. A.¹, Oliveira, T. D.¹, Oliveira, M. A.¹, Tavares-de-Lima, W.¹, Rodrigues, S. F.¹

¹Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO+OBJETIVO: A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) se desenvolve a partir de uma lesão pulmonar aguda (LPA), sendo comumente o resultado de causas primárias como pneumonia viral ou bacteriana, sepse e mais recentemente, a COVID-19. É caracterizada por uma resposta inflamatória excessiva que resulta em edema alveolar e hipóxia tecidual. Tecidos distantes, como o intestino, também podem desempenhar um papel na patogênese da SDRA (eixo pulmão-intestino). Apesar do uso de ventilação artificial e de corticosteroides como únicas estratégias de combate à SDRA, parte dos pacientes não responde a esse tratamento. Nesse contexto, testamos o inibidor de protease leucocitária secretória (SLPI), proteína expressa em superfícies mucosas que possui efeitos anti-inflamatórios, em modelo experimental de SDRA.

MÉTODOS: A SDRA foi obtida a partir da injeção por via intratraqueal (I.T.) de peptidoglicano (PPG) e ácido lipoteicoico (LTA) em camundongos C57Bl/6 (CEUA #9737280921), sendo repetida vinte e quatro horas após a primeira indução. Como controle, água destilada, também por via I.T. O tratamento com SLPI (0,2 mg/kg) foi realizado por via I.T. duas e vinte e seis horas após a indução com PPG/LTA. Foram medidos o número de células no lavado broncoalveolar (BAL), a concentração de proteínas neste fluido, alterações histológicas e o rolamento leucocitário no intestino por microscopia intravital de fluorescência.

RESULTADOS: Camundongos injetados PPG/LTA apresentaram maior número de células no BAL (495,1 +/- 19,9, N=8) em comparação ao grupo controle (12,9 +/- 1,2,) (P <0,0001, N=10), sendo constituídas principalmente por neutrófilos, e o tratamento com SLPI foi capaz de reduzir este número (412,6 +/- 21,5) (P <0,004, N=8). Maior concentração proteica foi observada no BAL dos animais induzidos com PPG/LTA em comparação ao grupo controle e não foi reduzido com o tratamento com SLPI. Foi observado o aumento da lesão tecidual pulmonar nos animais injetados com PPG/LTA comparado ao grupo SHAM, contudo o tratamento com SLPI não foi capaz de reduzir este dano. O rolamento de leucócitos nos vasos sanguíneos intestinais foi maior nos camundongos injetados PPG/LTA (10,7 +/- 0,4/min) (P <0,0001, N=7) em comparação ao grupo controle (4,7 +/- 0,2/min, N=7) e o tratamento com SLPI reduziu este parâmetro (6,6 +/- 0,6/min) (P < 0,0001, N=7).

CONCLUSÕES: O tratamento com SLPI reduz a presença de leucócitos no pulmão e isto pode se dever à redução da inflamação no intestino, mas isso não resultou na diminuição de dano tecidual e nem do edema.

Agências de fomento: FAPESP #2020/07212-7; #2022/13258-5; #2023/05115-2. CAPES: #88887.704584/2022-00; código financiamento nº 001.

Potencial farmacológico de microrganismos recuperados da ascídia *Ecteinascidia* sp. (Ceará, Brazil)

Elthon Gois Ferreira¹; Katharine Ayumi Kiyota Furtado²; Leticia Veras Costa-Lotufo¹; Paula Christine Jimenez²

1. Departamento de Farmacologia; Instituto de Ciências Biomédicas; Universidade de São Paulo (USP);
2. Departamento de Ciências do Mar; Instituto do Mar; Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Autor de correspondência: elthonferreira@usp.br

Palavras chave: Potencial Farmacológico; Citotoxicidade; Produtos Naturais Marinhos; Microrganismos Marinhos; Invertebrados Marinhos;

Introdução: Ascídias são invertebrados marinhos sésseis conhecidos como fonte abundante de compostos com potencial farmacológico, dos quais foram identificadas mais de 1.200 moléculas, como alcalóides, peptídeos e policetídeos que apresentam diversas propriedades farmacológicas. Além disso, as ascídias abrigam ricas comunidades microbianas que, devido ao seu talentoso metabolismo e habilidades de adaptação, esses microrganismos foram atribuídos como fonte de produtos naturais que inicialmente se pensava serem originários das ascídias. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial anticancerígeno de extratos obtidos do cultivo de bactérias marinhas recuperadas da ascídia *Ecteinascidia* sp., coletada no litoral oeste do Ceará. **Métodos:** Após a coleta do material biológico, foram removidos os contaminantes o tecido da ascídia, sendo em seguida completamente triturado e plaqueado em placas de ágar contendo meio com gradiente crescente de nutrientes. As placas foram mantidas em temperatura ambiente, observadas quanto ao crescimento microbiano, e colônias individualizadas com características específicas foram recuperadas e nomeadas. As cepas bacterianas recuperadas foram criopreservadas na coleção microbiana interna (MicroMarin). Para avaliar seu potencial anticancerígeno, as cepas recuperadas foram cultivadas em 100 mL de meio líquido A1 (Amido; Extrato de Levedura e Peptona) durante 7 dias sob agitação (150 rpm) a 28 °C, e extraídas durante 1 h com igual volume de acetato de etila, para obter um extrato bruto de cada cultura. A citotoxicidade dos extratos (0,0032 a 50 µg/mL) foi avaliada através do ensaio do MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) após 72h de exposição contra carcinoma colorretal (HCT-116) e linhagens celulares de câncer de adenocarcinoma de mama (MCF-7), e valores de IC₅₀ foram obtidos. **Resultados:** Vinte e duas cepas bacterianas foram recuperadas e avaliadas quanto à citotoxicidade. Entre estas, 4 extratos apresentaram citotoxicidade promissora contra células HCT-116 apresentando valores médios de contrações inibitórias de 3,77 (BRA-679), 6,13 (BRA-729), 8,27 (BRA-724) e 39,58 (BRA-680) µg/mL No entanto, nenhum extrato apresentou citotoxicidade relevante contra células MCF-7. **Conclusão:** Novos estudos devem envolver a classificação taxonômica de cepas promissoras, o teste de citotoxicidade em outras linhagens celulares e a identificação de compostos bioativos. No entanto, as cepas de microrganismos recuperadas de *Ecteinascidia* sp. revelou ter um potencial farmacológico significativo para a prospecção de novas moléculas com atividade anticancerígena. **Apoio Financeiro:** FUNCAP; CNPq (Processo 465637/2014-0) e FAPESP (Processo 2014/50926-0).

Investigação do Potencial Terapêutico do Composto 83 no Tratamento da Leucemia Linfocítica Crônica e seu papel no sinergismo com Venetoclax

Garnique A.M.B.¹, Jorge Antonio Elias Godoy Carlos¹, Keli Lima³, Natália Sudan Parducci¹, Mauricio Temotheo Tavares², Karoline de Barros Waitman², Leticia Veras Costa-Lotufu¹, Roberto Parise-Filho², João Agostinho Machado-Neto¹.

¹Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

³Laboratório Investigação Médica em Patogênese e Terapia dirigida em Onco-Imuno-Hematologia (LIM-31), Departamento de Medicina interna, Divisão de Hematologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma condição caracterizada pelo aumento da produção de linfócitos B maduros CD5+ no sangue, medula óssea, baço e tecidos linfoides. No entanto, essas células são disfuncionais devido a alterações genômicas que comprometem seu comportamento e função normais. A ativação do receptor de célula B (BCR) leva à superexpressão e ativação da tirosina quinase de Bruton (BTK), estimulando vias de sinalização intracelular que promovem a proliferação e sobrevivência das células leucêmicas. Além disso, modificações realizadas pela histona desacetilase (HDAC) têm sido associadas à progressão da LLC, com sua superexpressão sendo um potencial fator prognóstico. Nos últimos anos, inibidores de HDAC foram desenvolvidos, eles atuam na acetilação de proteínas o que resulta em inibição da invasão celular, sensibiliza células à quimioterapia, induz apoptose e aumenta a imunogenicidade. Em contraste, a superexpressão da proteína anti-apoptótica BCL2 confere às células de LLC resistência à apoptose. Para combater essa resistência e promover a morte das células tumorais, o venetoclax (ABT-199), um inibidor altamente seletivo da proteína BCL2, tem sido utilizado. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o potencial antineoplásico de um novo inibidor híbrido para HDAC e BTK, chamado de Composto 83 (C83). Foi avaliado também o sinergismo entre o venetoclax e o C83, visando potencializar os efeitos antitumorais e explorar sinergias terapêuticas entre os dois agentes. Nós observamos por análise de banco de dados que HDACs se encontram super expressos em pacientes com LLC. A linhagem celular MEC-1 foi utilizada como modelo experimental, e os resultados demonstraram que o C83 apresentou IC50 menor do que o vorinostat (inibidor comercial de HDAC), indicando maior eficiência na diminuição da viabilidade e do crescimento clonal quando comparado ao vorinostat. Além disso, observou-se que tanto o C83 quanto o vorinostat foram capazes de alterar a distribuição das fases do ciclo celular e observamos também aumento na indução de apoptose. Isto sugere interferência desses agentes nos processos de divisão, proliferação e morte celular. Para compreender melhor os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos do C83 e do vorinostat, foi montado um painel de genes relacionados a processos celulares importantes tais como autofagia, ciclo celular, *checkpoint* mitótico e morte celular. Essa análise permitiu identificar os principais genes e vias afetadas pelos compostos usados, fornecendo *insights* sobre os mecanismos de ação do C83. A expressão proteica foi avaliada como forma de validar os resultados anteriormente obtidos. Foi observado que o C83 aumenta a expressão da acetil histona H-3 e da acetil α -tubulina, indicando sua atividade como inibidor de HDAC. Além disso, observou-se diminuição da expressão de NF κ B fosforilada, sugerindo a inibição da via de sinalização mediada por BTK. Outro achado importante em este estudo foi o efeito sinérgico observado entre o venetoclax e o C83. A combinação desses dois agentes resultou em maior inibição do crescimento celular e na indução de apoptose em comparação com o uso isolado de cada um. Em resumo, o presente estudo caracterizou o potencial antineoplásico do composto 83 (C83), um novo inibidor híbrido para HDAC e BTK, no tratamento da LLC. Os resultados atestam a eficácia do C83, estabelecendo uma fundação robusta para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas

combinadas para o tratamento da LLC e assim proporcionar alternativas terapêuticas inovadoras aos pacientes.

Palavras-Chave: *Leucemia Linfoide Crônica; Tirosina quinase de Bruton; Histona desacetilase; Sinergimo ; Venetoclax*

Agradecimentos à FAPESP, CNPq e CAPES

CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DO DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA ADQUIRIDA AO VENETOCLAX EM MODELOS DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

de Queiroz¹, G.N., Lima², K., Cipelli³, M., Rego^{2,4}, E.M., Câmara³, N.O.S., Costa-Lotufo¹, L.V., Machado-Neto¹, J.A.

¹ Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

² Laboratório de Pesquisa Médica em Patogênese e Terapia-Alvo em Onco-Imuno-Hematologia, Departamento de Clínica Médica, Divisão de Hematologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

³ Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

⁴ Centro de Terapia Celular, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Introdução: Venetoclax inibe BCL2, proteína antiapoptótica que é superexpressa e desempenha um papel importante na patogênese da leucemia mieloide aguda (LMA).

Objetivos: Induzir resistência nas células leucêmicas mais sensíveis ao venetoclax, assim como caracterizar os efeitos moleculares e biomoleculares da resistência farmacológica, com venetoclax.

Métodos: As linhagens celulares leucêmicas de U-937, NB4, Kasumi-1, MOLM-13, MV4-11 e THP-1, foram utilizadas. A viabilidade e resistência celular foi avaliada por ensaio de MTT, a clonogenicidade pelo ensaio de formação de colônias, a apoptose, dano mitocondrial e ciclo celular por citometria de fluxo, o perfil metabólico foi analisado por Seahorse XF96 e as vias de sinalização por Western blotting. Os testes de Spearman, Mann-Whitney ou ANOVA foram utilizados conforme apropriado. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

Resultados: O tratamento com venetoclax reduziu de forma dependente de tempo e de concentração a viabilidade celular de todos os modelos avaliados. As células MOLM-13-VR e MV4-11-VR expostas a concentrações crescentes de venetoclax apresentaram resistência 200 vezes em comparação com as células parentais ($p < 0.05$). Foi observado

menores taxas de dano mitocondrial e apoptose nas células resistentes após exposição ao fármaco ($p < 0.05$), como também a formação de colônias e ciclo celular se manteve estável, quando comparadas as células parentais ($p < 0.05$). No cenário molecular, a expressão de proteínas relacionadas a marcadores de apoptose (clivagem de PARP1), dano em DNA (γ H2AX) é menor nas células de LMA resistentes, após exposição ao venetoclax.

Conclusão: O desenvolvimento das células resistentes ao venetoclax, MV4-11-VR e MOLM-13-VR, foi efetivo através da exposição intermitente e escalonada ao fármaco. A resistência farmacológica ao venetoclax apresentou que a expressão de proteínas relacionados ao dano de DNA e apoptose está reduzido nas células resistentes.

Apoio financeiro: FAPESP, CNPq e CAPES.

AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS PARA ENCAPSULAÇÃO DE PACLITAXEL E TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

Passos, J.S., Machado-Neto, J.A., Panitch, A., Lopes, L.B.

Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: O câncer de mama é uma das neoplasias mais incidentes em mulheres e aproximadamente 25% dos casos são classificados como carcinoma ductal *in situ* (CDIS). Nesse estudo, desenvolvemos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e nanopartículas híbridas (NP-H) lipídica-poliméricas para a administração de paclitaxel, e avaliamos seus efeitos em células tumorais de mama.

Métodos e Resultados: CLN foram obtidos por sonicação em haste e encapsulados em uma casca polimérica de poli(N-isopropilacrilamida) para obtenção da NP-H. As nanopartículas foram caracterizadas por distribuição de tamanho, microscopia eletrônica de varredura e liberação do fármaco. O efeito citotóxico dos tratamentos foi avaliado em células MCF-7 e MDA-MB-231 por meio do ensaio de MTT; ainda avaliamos a modulação da expressão de proteínas de interesse (acetil- α -tubulina e γ H2AX) pelo ensaio de *Western blotting*. Ambas as nanopartículas apresentaram tamanho < 400 nm e alta eficiência de encapsulação do fármaco (>76%), e a NP-H foi capaz de sustentar a liberação de paclitaxel por até 120 h. Os CLN (IC₅₀ 1.1 – 5.0) apresentaram maior citotoxicidade do que NP-H (IC₅₀ 2.1 – 7.2) e uma solução controle do fármaco em ambas as linhagens celulares; o efeito citotóxico das nanopartículas foi dependente da linhagem celular, sendo os valores de IC₅₀ obtidos em células MDA-MB-231 até 14.7 vezes mais elevados do que aqueles obtidos em MCF-7. Em ambas as linhagens celulares, as nanopartículas com paclitaxel induziram acetilação da α -tubulina, um marcador de estabilidade de microtúbulo, o que pode ser atribuído ao mecanismo de ação do fármaco de aumento da estabilização de microtúbulos polimerizados. Sobretudo para a linhagem MCF-7, foi observada acetilação da tubulina de células tratadas com as nanopartículas vazias, o que sugere efeitos mesmo na ausência do fármaco. Em ambas as linhagens, o CLN e a NP-H contendo paclitaxel foram as que mais induziram dano ao DNA, como sugerido pela elevada expressão de γ H2AX, em todas as concentrações avaliadas e se correlaciona com a maior redução da viabilidade celular observada nos ensaios anteriores.

Conclusão: Nossos dados sugerem que ambos os tratamentos foram capazes de alterar a polimerização de microtúbulos e causar dano ao DNA. Embora o CLN tenha apresentado maior citotoxicidade em células tumorais comparada às NP-H, a encapsulação do CLN em uma casca polimérica resultou em maior sustentação da liberação do fármaco, o que pode contribuir com a eficácia e menor frequência de administração.

Apoio Financeiro: FAPESP (#2021/12664-7, #2020/01208-8 e #2018/13877-1), CNPq (#306866/2020-0) e CAPES – Agência Federal Brasileira de Apoio e Avaliação de Pós-Graduação do Ministério da Educação do Brasil (código de financiamento 001).

NANOEMULSION CO-DELIVERY OF PACLITAXEL AND P-GLYCOPROTEIN INHIBITOR SUPPRESSES CLONOGENICITY, ALTERS CELL CYCLE, AND PROMOTES APOPTOSIS IN MDA-MB-231 TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER CELLS

Salata G. C. ¹, Machado-Neto J. A. ¹, Malagó I. D. ¹, Melo G. B. ¹, Lopes L. B. ¹

¹ Department of Pharmacology – Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Ductal carcinoma in situ (DCIS) accounts for 25% of breast cancer cases. Due to its potential to become invasive, especially in patients with the rare triple-negative DCIS, current treatments often involve aggressive interventions such as surgery, radiation, and hormone therapy. This underscores the need for new, effective, and localized treatment strategies. In this study, we developed tributyrin and hyaluronic acid nanoemulsions (NE) for local intraductal co-administration of the cytotoxic drug paclitaxel (P). Given paclitaxel's susceptibility to efflux mediated by P-glycoprotein (P-gp), a transporter often linked to drug resistance, we co-encapsulated the P-gp inhibitor elacridar (E) with paclitaxel. The resulting nanoemulsion containing E and/or P was obtained by sonication, exhibiting a hydrodynamic droplet size of 165 ± 15 nm and Zeta potential ranging from -32 to -42 mV. Viability assays on triple-negative breast cancer cells (MDA-MB-231) showed that after 48 hours, treatment with NE-P+E reduced the IC₅₀ values (concentration in $\mu\text{g/ml}$ to kill 50% of the cell population) by 36.7 and 2.9-fold compared to P+E solution and NE-P, respectively. A clonogenic assay with IC₁₅ treatment and a 6-hour exposure demonstrated that the unloaded NE did not hinder colony formation ($76\pm 34.9\%$ compared to control 100%), whereas groups containing P, either in solution or incorporated into the NE, significantly reduced colony formation by more than 70.5% ($p < 0.0001$, ANOVA-Tukey). The nanocarrier also induced G₂/M cell cycle arrest with IC₃₀ treatment and significantly increased the population in sub-G₁ (indicative of cell death) by 5.8-fold ($p < 0.0001$, ANOVA-Tukey) compared to the untreated control. Annexin V and Propidium Iodide staining after 48-hour treatment with IC₃₀ indicated that the primary cell death pathway induced by P was apoptosis (over 30% of the population). Encapsulation of P in the NE did not alter this mechanism, even with the incorporation of elacridar (30.6% apoptosis and 1.1% necrosis). Western blot analysis revealed that NE P+E downregulated the anti-apoptotic marker BCL-2 by 2.5-fold and upregulated pro-apoptotic proteins such as γ H2AX and PARP-1 by 17.5-fold and 4.8-fold, respectively, compared to the untreated control. These findings indicate that the NE loaded with both drugs reduces the tumorigenicity and clonogenicity of triple-negative breast cancer cells, thereby lowering the probability of cancer recurrence and potentially improving patient outcomes.

Financial support: FAPESP (#2019/26048-6 and #2018/13877-1), CAPES (finance code 001), CNPq (#306866/2020-0) and INCT-NANOFARMA, which is supported by FAPESP (grant #2014/50928-2) and CNPq (grant #465687/2014-8).

ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS FUNCIONAIS E NEUROANATÔMICAS SEXO-DIMÓRFICAS EM UM MODELO MURINO DA DOENÇA DE PARKINSON.

Rodrigues¹, G.M., Aquino¹, Y.C.,
Moreira², T.S., Takakura¹, A.C. ¹Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP; ²Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

Introdução e Objetivo: A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela diminuição dos neurônios dopaminérgicos na substância negra (SN), levando a comprometimentos motores. Além dos sintomas motores clássicos, a DP pode manifestar sintomas não clássicos, incluindo déficits respiratórios. A DP é observada como sendo duas vezes mais comum em homens do que em mulheres. Estudos em camundongos machos sugerem que os déficits respiratórios observados na DP podem ser causados por danos às áreas responsáveis pelo controle neural da respiração. Portanto, nosso objetivo foi investigar a influência dos hormônios sexuais nos aspectos neuroanatômicos e fisiológicos da função respiratória na DP.

Métodos e Resultados: Camundongos adultos C57BL/6 (machos: 34 e fêmeas: 50; CEUA: 3325170822) foram submetidos a orquiectomia (ORX), ovariectomia (OVX) ou cirurgia fictícia. Após um período de recuperação de duas semanas, o modelo de DP foi induzido por injeções bilaterais de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) ou veículo no estriado. A eficácia da OVX e da ORX foi avaliada medindo-se o peso do útero seco e das vesículas seminais e porção anterior da próstata, respectivamente. Os parâmetros respiratórios foram obtidos por pletismografia de corpo inteiro e as alterações neuroanatômicas foram investigadas por imunohistoquímica. Todos os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média e para cada análise $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Camundongos OVX que receberam 6-OHDA no estriado mostraram uma redução ainda maior no número de neurônios tirosina hidroxilase (TH+) na SN ($30,8 \pm 1,6$ vs. sham+6-OHDA: $63,8 \pm 2,4$ neurônios, $p=0,0014$), na densidade de receptores de neurocinina 1 (NK1r) no Complexo pré-Bötzing ($28,3 \pm 0,7$ vs. sham+6-OHDA: $33,6 \pm 0,6\%$, $p=0,0060$) e no número de neurônios p α 2b no Núcleo Retrotrapezóide ($35,0 \pm 1,8$ vs. sham+6-OHDA: $44,3 \pm 1,2$ neurônios, $p=0,0399$). A redução na frequência respiratória em repouso foi ainda mais pronunciada ($151,1 \pm 2,4$ vs. sham+6-OHDA: $161,0 \pm 1,2$ bpm, $p < 0,0001$). Em camundongos OVX, foi observado um aumento significativo no receptor de estrógeno alfa em toda a coluna respiratória ventral. Embora a ORX não tenha afetado o número de perfis neuronais ou a frequência respiratória, reduziu o número de células TH+ na SN ($272,8 \pm 5,9$ vs. sham: $306,6 \pm 8,8$ neurônios, $p=0,0026$).

Conclusão: Nossos resultados indicam que a OVX aumenta a neurodegeneração na SN, no Complexo pré-Bötzing e no Núcleo Retrotrapezóide, exacerbando a redução na frequência respiratória induzida por 6-OHDA, sugerindo que o estrógeno desempenha um papel neuroprotetor.

Apoio Financeiro: FAPESP, CNPq e CAPES-PROEX.

INVESTIGATING THE PHARMACODYNAMIC AND CYTOTOXIC EFFECTS OF METHOTREXATE COENCAPSULATION WITH IRON OXIDE NANOPARTICLES INTO ETHOSOMES IN 3D BREAST CANCER MODELS

Melo, G.B.¹, Kawassaki, R.K.^{1,2}, Garnique, A.D.M.B.¹, Guimarães, R.R.², Machado-Neto, J.A.¹, Araki, K.², Lopes, L.B.¹

¹Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

² Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, Brazil

Introduction and Objectives

Breast cancer is the leading cause of death among women worldwide, presenting challenges in treatment and diagnostics. Nanomedicine shows promise in improving cancer targeting, reducing non-specific drug toxicity and integrating treatment with diagnostics through theranostic systems. We developed a theranostic nanosystem comprising methotrexate (MTX) and iron oxide nanoparticles (UPN) coencapsulated in ethosomes for localized delivery into the breast ducts (intraductal). We aimed to investigate the nanocarrier effects on cell viability and methotrexate molecular effects, and thus, understand whether and how coencapsulation improves cytotoxicity.

Methods and Results

Ethosomes were synthesized via ethanol injection and their size was around 100 nm. MCF-7 breast cancer spheroids were obtained by the liquid overlay technique and their viability was assessed after 48 h of treatment with unloaded ethosomes, ethosomes containing MTX and UPN (Et MTX+UPN), or MTX solution using resazurin and double staining (Hoechst and Propidium iodide, PI) assays. The IC₅₀ resulting from Et MTX+UPN treatment was 23.7-fold lower compared to MTX solution while PI staining increased, indicating enhanced cell death under Et MTX+UPN treatment. Evaluation of ethosome-mediated penetration in spheroids were conducted after treatment for 24 and 48 h using rhodamine-labelled phosphatidylcholine to produce the ethosomes and MTX-fluorescein-loaded ethosomes. Penetration of ethosomes and/or its contents was observed after 48 h; additionally, encapsulation of MTX in ethosomes increased its penetration into spheroids compared to its solution, especially after 48 h. Western Blot was employed to investigate whether MTX coencapsulation with UPN mediated changes in drug signaling by assessing the expression of Bcl-2, PARP-1, Bax and acetyl- α -tubulin in spheroids. A significant increase in Bax (4.8-fold) and acetyl- α -tubulin (1.9-fold) expression was observed under Et MTX+UPN treatment, corroborating the enhanced nanocarrier cytotoxicity.

Conclusion

Our findings indicate that the coencapsulation of MTX and UPN in ethosomes enhances cytotoxicity in breast cancer spheroids compared to MTX solution, supported by viability assays and corroborated by Western Blot analysis. Penetration studies indicate that an enhanced penetration mediated by ethosomes may contribute to the increased cytotoxicity reported.

Financial

Support

FAPESP (2023/13424-5; 2018/13877-1; 2019/02151-2), CNPq (442599/2019-6), CAPES (001).

PHYSICAL EXERCISE PREVENTS NEURODEGENERATION IN CARDIORESPIRATORY NUCLEI AND BREATHING DEFICITS IN THE 6-OHDA MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

Medeiros, P.O.S.¹; Pedrão, L.F.A.T.¹; Falquetto, B.¹

¹ Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo. São Paulo, Brazil.

Introduction: Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease with death of dopaminergic neurons in the Substantia Nigra (SN). It presents classic symptoms, and respiratory problems. There is neurodegeneration in cardiorespiratory regions such as nucleus of solitary tract (NTS), retrotrapezoid nucleus (RTN), preBötzinger complex (preBötC), rostral ventral respiratory group (rVRG) and nucleus ambiguus (NA), noted in 6-hydroxydopamine (6-OHDA) PD animal model, causing a high loss in cardiorespiratory function.

Aim: Evaluate the effects of the physical exercise (EX) preventing the neurodegeneration of cardiorespiratory nuclei and the cardiorespiratory deficits in 6-OHDA animals.

Methods: 6-OHDA (24mg/ml) or vehicle was injected into male adult rat's striatum. EX was performed 12 days after PD induction (n=42), for 28 days. On the 40th day, the animals were submitted to whole-body plethysmography, perfusion, and brain dissection to perform immunohistochemistry. All animals were submitted to tyrosine hydroxylase (TH)-immunoreactivity (ir) to evaluate SN to confirm the PD model, and phox2b, NK1R and ChAT-ir to evaluate cardiorespiratory nuclei degeneration. Two-way ANOVA followed by Newman Keuls was applied with $p < 0.05$.

Results: 6-OHDA reduced TH⁺ neurons in SN and EX did not reverse it as expected, confirming the PD model ($p < 0,0001$). At normoxia, 6-OHDA animals showed reduced respiratory frequency (f_R), prevented with EX (vehicle: $98,8 \pm 5,6$; 6-OHDA: $60,9 \pm 3,3$; vehicle + EX: $87,9 \pm 12,5$; 6-OHDA + EX: $85,9 \pm 9,3$ bpm; $p < 0,0001$); as well during hypercapnia (f_R : vehicle: $150,1 \pm 17,9$; 6-OHDA: $125,3 \pm 4,0$; vehicle + EX: $159,1 \pm 13,3$; 6-OHDA + EX: $154,7 \pm 14,3$ bpm; $p = 0,0062$). We observed a reduction in phox2b neurons in cNTS (vehicle: 135 ± 20 ; 6-OHDA: 52 ± 7 ; vehicle + EX: 124 ± 23 ; 6-OHDA + EX: 87 ± 13 neurons, $p < 0,0001$), iNTS (vehicle: 917 ± 128 ; 6-OHDA: 548 ± 64 ; vehicle + EX: 1009 ± 229 ; 6-OHDA + EX: 744 ± 42 neurons, $p < 0,0001$) and RTN (vehicle: 52 ± 7 ; 6-OHDA: 21 ± 12 ; vehicle + EX: 57 ± 16 ; 6-OHDA + EX: 44 ± 4 neurons; $p = 0,0003$) in sedentary groups and this was prevented with EX. The same was observed in NK1R-expressing neurons in rVRG

(vehicle: $104,7 \pm 19,9$; 6-OHDA: $68,1 \pm 7,3$; vehicle + EX: $104 \pm 22,8$; 6-OHDA + EX: $97,5 \pm 7,1$) and preBötC (vehicle: $108 \pm 31,1$; 6-OHDA: $64,8 \pm 3,9$; vehicle + EX: $103,9 \pm 24,6$; 6-OHDA + EX: $101,2 \pm 4,5$). Neurodegeneration was also seen in ChAT neurons in NA, prevented with EX (vehicle: 61 ± 10 ; 6-OHDA: 34 ± 7 ; vehicle + EX: 74 ± 14 ; 6-OHDA + EX: 48 ± 13 neurons; $p < 0,0001$).

Conclusion: All the respiratory impairments and neurodegeneration was prevented after EX in the 6-OHDA PD model.

Financial support: CAPES - 88887.684788/2022-00, FAPESP (2021/08562-4); **CEUA:** 1342290421

INVOLVEMENT OF PRECOCIOUS OVULATION ON LUNG MECHANIC AND INFLAMMATION IN A MURINE MODEL OF ASTHMA

Alves, V.F.¹; Melhado, I.V.S.¹; Ribeiro, M.R.¹; Oliveira, MA.¹; Moriya, H.T.²; Frajblat, M.³; Tavares-de-Lima, W.¹

¹Institute of Biomedical Sciences, Dept. of Pharmacology, University of São Paulo, São Paulo Brazil, ²Polytechnic School, Dept. of Telecommunication and Control Engineering, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Federal University of Rio de Janeiro, Health Sciences Center, Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics

Introduction: Allergic asthma is a chronic inflammatory airway disease whose symptoms are modulated by sex hormones in women. Clinical evidence shows that in recent years the age of menarche has decreased, characterizing precocious menarche. However, the role of precocious ovulation (PO) as a consequence of hormonal changes on asthma is yet unclear.

Objectives: To establish an experimental protocol of PO in mice and to evaluate the allergic lung inflammation using a murine model of asthma.

Methods: PO protocol was induced in female Balb/C mice (21-day old). Five international units (IU) of equine chorionic gonadotropin (eCG) were administered intraperitoneally, followed by 5 IU of human chorionic gonadotropin (hCG) by the same route 2 days later, marking the first of three cycles of the hormonal treatment (HT). Control mice were treated with phosphate-buffered saline (PBS). PO was evaluated by the vaginal opening and examining cells recovered from vaginal lavage (VL) using optical microscopy. At the end of the third cycle, the levels of circulating estradiol were measured with a commercial ELISA kit and the presence of ovarian corpora lutea was assessed by histological methods.

In a parallel study group, after the three cycles of HT, mice were sensitized with subcutaneous ovalbumin (OVA) and subsequently OVA-challenged once a week by intranasal instillation for three consecutive weeks. The control group consisted of mice treated with PBS. The studies were carried out 24 h after the last OVA-challenge. The respiratory mechanical parameters were determined after methacholine (MCh) provocation (FlexiVent, SCIREQ[®], Canada) and pulmonary inflammation was characterized by quantifying the cells recovered in bronchoalveolar lavage (BAL). Four groups were used: HT-allergic and non-allergic; PBS-allergic and non-allergic. Data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's post-test ($*p<0.05$)

Results: The 1st cycle of HT induced vaginal opening and morphological changes in VL cells, which are consistent with puberty ($n = 35$) at 3.4 weeks of mice lifespan, whereas in PBS group ($n=30$) such changes were observed at 4.3 weeks old. After the 3rd cycle of HT (6 weeks old), serum levels of estradiol were elevated (HT: 112.3 ± 7.4 ; $n = 10$; PBS: 32.4 ± 3.2 , $n = 10$, pg/mL, $p<0.0001$). Corpora lutea were identified before the 8th week of life only in HT mice ($n = 12$).

Allergy in PBS mice increased the lung resistance (R_L , expressed as cmH₂O.s/mL), (allergic: 3.08 ± 0.46 , $n = 12$; non-allergic: 1.31 ± 0.15 , $n = 7$, $p<0.0001$), increased total cells (cells $\times 10^4$ /mL), (allergic: 127.11 ± 16.53 , $n = 11$; non-allergic: 17.21 ± 3.63 , $n=7$, $p<0.001$) and eosinophils (allergic: 87.70 ± 15.80 , $n:10$; non-allergic: 0.04 ± 0.04 , $n = 8$, $p<0.0001$). Allergic mice of the HT group intensified the augmented pulmonary R_L to MCh (HT: 5.38 ± 1.08 , $n =11$; PBS: 4.00 ± 0.46 , $n =12$, $p<0.05$) as well as total cells number (HT: $210.6 \pm$

36.6, n = 11; PBS: 127.1 ± 16.53 , n = 11, $p < 0.05$). No differences in these parameters were observed comparing HT-non allergic and PBS-non allergic mice.

Conclusion: Our data demonstrated that HT (eCG and hCG) effectively induced PO in mice. PO determined exacerbation of lung inflammation and pulmonary resistance to cholinergic stimulation caused by allergic asthma. Our study could provide valuable insights for experimental investigations into the lung repercussions associated with early menarche.

Financial support: CAPES and CNPq.

EFFECTS OF MATERNAL MELATONIN DEFICIENCY ON THE HIPPOCAMPAL CHOLINERGIC MUSCARINIC NEUROTRANSMISSION IN THE OFFSPRING

Silva JRM¹, Aliaga ALB², Lima PH², Tida-Oliveira CH², Andreotti DZ¹, Sandoval MRL², Cipolla-Neto J³, Amaral FG⁴, Abdalla FMF², Afeche SC², Iwashe EMK¹

¹Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, USP, Brazil;

²Department of Pharmacology, Butantan Institute, Brazil;

³Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, USP, Brazil;

⁴Department of Physiology, Federal University of São Paulo, Brazil;

Introduction and Objectives: Studies have shown that the absence of maternal melatonin during pregnancy and lactation can generate changes in neural development, such as deficiencies in learning and spatial memory. On the other hand, the administration of melatonin after birth increases cell proliferation and differentiation as well as the survival of new neurons in the hippocampus. The muscarinic cholinergic system is involved in the regulation of different processes in the central nervous system. We investigated the role of maternal melatonin on the expression of hippocampal cholinergic muscarinic receptors (mAChRs) of male adult rats offspring in which gestation and lactation occurred under conditions of hypomelatoninemia. **Methods and Results:** Three experimental groups were made: 12 maternal rats were pinealectomized (PINX), 6 maternal rats were also pinealectomized, but melatonin was replaced (PINX+MEL) and 6 maternal rats were used as control (CTR). Melatonin was replaced in drinking water, during the dark period, for the PINX+MEL group, after surgery and during pregnancy and lactation, at a dose of 0.1mg/kg of body weight being adjusted weekly. The offspring of ninety-day-old male rats were euthanized at ZT2 (2h after the beginning of the light period). [³H]QNB and polyclonal primary antibodies specific for each of the mAChRs subtypes were used in order to evaluate M₁ to M₅ (protocol n° 9805191021). The absence of maternal pineal melatonin during pregnancy and lactation (PINX), induced an increase in the expression of the M₁ subtype and a reduction in the expression of the M₂ subtype of mAChRs when compared to the control group. The melatonin hormone replacement reversed the changes induced by maternal melatonin deficiency. **Conclusion:** Our results showed that the absence of maternal melatonin during pregnancy and lactation influences hippocampal cholinergic synaptic transmission in the adult offspring, through the modulation of the expression of M₁ and M₂ subtypes of mAChRs.

Supported by CAPES and FAPESP 9805191021.

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES POLÍMEROS NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS COM SERINIQUINONA CONTRA MELANOMA

Maia, R.A., Miguel, R.A., Costa-Lotufo, L.V., Lopes, L.B. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: A alta malignidade e aumento da incidência do melanoma, somadas à resistência às principais monoterapias em uso, colocam em perspectiva a necessidade de pesquisar por novos candidatos à terapia. A modulação farmacológica da proteína dermicidina com a seriniquinona (SQ), o único agente descrito com tal atividade e produzido por uma bactéria marinha do gênero *Serinicoccus*, demonstrou atividade antitumoral e seletividade contra o melanoma. Mas, a solubilidade da SQ em veículos aquosos não tóxicos é limitada e se tornou um obstáculo para preparação de uma formulação passível de administração sistêmica. Diante disso, nosso grupo desenvolveu nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA-NPs) para veiculação da SQ em solventes aquosos. Este trabalho objetiva otimizar a formulação das PLGA-NPs e comparar a influência da massa molecular (Mw) e da razão de ácido poliláctico (PLA) e ácido poliglicólico (PGA) de diferentes polímeros nas características físico-químicas e na citotoxicidade das PLGA-NPs encapsuladas com SQ (PLGA-SQ-NPs).

Métodos e Resultados: Os polímeros utilizados foram: PLGA-1 (Mw: 24-38 kDa), PLGA-2 (Mw: 38-54 kDa), ambos com 50:50 PLA:PGA; e PLGA-3 (Mw: 66-107 kDa, 75:25 PLA:PGA). O tamanho e o índice de polidispersão (PDI) das PLGA-NPs foram aferidos por espalhamento dinâmico de luz e microscopia eletrônica de transmissão, também utilizada para observar a morfologia. A eficiência de encapsulação (EE) da SQ nas NPs e a cinética de liberação foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Por fim, a viabilidade celular foi avaliada em monocamada com as linhagens SK-MEL-28 e SK-MEL-147 pelo ensaio de sulforodamina B. Em geral, todas as NPs apresentaram formato esférico. Observou-se que as NPs de PLGA-1 e PLGA-2 apresentaram tamanhos similares (260-270 nm), enquanto as de PLGA-3 se demonstraram maiores (364,1 nm) ($p < 0,0001$). Já o PDI demonstrou ser diretamente proporcional ao aumento da Mw: 0,08, 0,16 e 0,20, respectivamente. PLGA-2-NPs possuíram a maior EE (90%), seguidas das com PLGA-3 (88%) e PLGA-1 (83%); porém, maiores EEs não se associam diretamente à taxa de liberação de SQ, a qual foi de 17% para as PLGA-1-NPs em 96 horas comparada com 7% para o PLGA-2. Ao avaliar a atividade antimelanoma das NPs, pode-se observar que a encapsulação de SQ não prejudicou a atividade da molécula, a concentração letal de 50% para as PLGA-SQ-NPs foi de 6,432 μM para a SK-MEL-28 e 6,701 μM para a SK-MEL-147, valores similares para SQ em DMSO.

Conclusão: Pequenas variações de Mw não são suficientes para alterar o tamanho das NPs, mas puderam deixar a dispersão mais heterogênea, além de permitir uma possível maior interação com a SQ influenciando a EE e modificando a cinética de liberação. Ainda, o efeito da formulação na viabilidade celular é devido à atividade da SQ, já que NPs sem SQ tiveram quase a nenhum efeito citotóxico.

Apoio Financeiro: FAPESP (2018/13877-1, 2022/15832-0 e 2024/01714-1); CAPES (001).

Acute Running Stimulus Induces Lower Cellular Activation Rate in the Dentate Gyrus of Aged Mice Compared to Young Mice. Silva, J.N., Rodrigues, B.A., Kawamoto, E.M. Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil.

Introduction: Several studies have indicated the importance of physical exercise to promote cognition, including during aging. It is important to highlight that the stimulus of physical exercise induces hippocampal neurogenesis, which occurs in the region of the dentate gyrus (DG). During aging, various losses can occur in the CNS, such as neurodegeneration, for example, impacting several important processes developed by neural circuits, which can lead to cognitive declines. Several works discuss strategies to improve neurogenesis as a potential treatment for conditions related to cognitive decline, mood disorders and neurodegenerative diseases. Therefore, understanding which stimuli can promote improvements in neurogenesis, in addition to the mechanism, can be extremely important. The objective of this work was to evaluate whether, when faced with the stimulus of acute aerobic physical exercise, aged mice would present changes in the rate of cellular activation in the region of the Dentate Gyrus. And whether there would be any difference in these changes in relation to sex.

Methodology: Adult (3 months) and aged (19 months) male and female mice (C57 isogenic mice) were used (protocol number CEUA 2623110719). Immunohistochemistry, microscopic analysis, and treadmill running were performed. The animals, young and old, were separated into groups: “controls” (animals that did not run) and “animals that ran”. The region of the dentate gyrus was evaluated rostro-caudally. The analysis was carried out at 5 levels of the brain bilaterally (slices cut at 30 μm – with a distance of 180 μm between each slice), covering the anteroposterior distance -1.74 to -2.46 mm rostral to bregma.

Results: In the DG of aged male mice exposed to the running stimulus, we observed a significantly higher mean immunostaining for *c-Fos* when compared to animals that did not run (controls) (aged male runners = 30.32 ± 0.72 vs aged male controls = 22.00 ± 1.33 ($p = 0.0032$)). Young males exposed to running also showed a significant increase in *c-Fos* immunostaining (young male runners = 54.67 ± 2.19 vs young male controls 26.73 ± 2.26 ($p < 0.0001$)). Regarding females, in the DG of aged female mice exposed to the running stimulus, we observed a significantly higher mean immunostaining for *c-Fos* when compared to control animals (aged female runners = 30.28 ± 1.29 vs females aged controls = 18.95 ± 1.27 ($p < 0.0001$)). Young females exposed to running also showed a significant increase in *c-Fos* immunostaining (young female runners = 46.90 ± 1.99 vs young female controls 28.84 ± 1.70 ($p < 0.0001$)). Only in female mice did we find a significant difference in the mean basal *c-Fos* immunostainings (aged control

females = 18.95 ± 1.27 vs young control females = 28.84 ± 1.70 ($p= 0.0002$)), showing that there was a reduction of basal *c-Fos* immunostaining in the DG related to female sex.

Conclusion: We evidenced that aged mice showed a lower rate of *c-Fos* labeling in the DG when exposed to the stimulus of acute running, when compared to young animals, indicating that the region responsible for hippocampal neurogenesis would be affected in aging, since in the face of the stimulus promoted by acute running, has a lower rate of neuronal activation than young animals.

Financial support: FAPESP, CNPq

EVALUATION OF THE EFFECT OF PRENATAL EXPOSURE TO VALPROIC ACID ON THE BEHAVIOR OF MALE MICE

Rodrigues, B.A., Silva, J.N., Lima, T.A., Kawamoto, E.M., Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences-USP

Introduction and Objectives

Valproic acid (VPA) is a drug used to treat epilepsy and as a mood stabilizer in bipolar disorder. Prenatal exposure to VPA results in behavioral deficits similar to those observed in autistic patients. Therefore, this drug is related to the development of communication and cognitive deficits and altered behaviors. The objective was to investigate possible altered behaviors in the offspring of male mice exposed in utero to VPA.

Methods and Results

Pregnant female mice (C57/BL6) were separated into two groups: a control group and the VPA group. VPA or 0.9% saline solution were injected intraperitoneally, in two doses of 300 mg/kg each, on embryonic days 10 and 12. At one month old, the males (n=16 each group) were exposed to the behavioral tests: Open Field Test, Elevated Plus Maze, Social Interaction and Inhibitory Avoidance, therefore, anxiety-like behavior, mobility, social interaction and memory were evaluated. The statistical analysis was performed using the unpaired Student's T-Test in the GraphPad Prism. Project approved by Ethics in the Use of Animals Committee 2945190521. In the Open Field test, a statistically significant increase in immobility time (41% compared to control, $p=0.0003$; $t=4.106$) and a significant increase in freezing time was observed in the group exposed to VPA (244% compared to the control, $p=0.0491$; $t=2.051$). In the Elevated Plus Maze test, a statistically significant increase in time in closed arms (16% compared to the control, $p=0.0110$; $t=2.707$), a significant reduction in time in open arms (36% compared to the control, $p=0.0218$; $t=2,416$) and a significant reduction in the number of entries into the open arms was observed in the group exposed to VPA (23% compared to the control, $p=0.0186$; $t=2.484$). In the Social Interaction test, the VPA group showed a significant reduction in social interaction with the unknown animal (59% compared to the control, $p<0.001$; $t=7.240$), however, there was a significant increase in interaction with the object (54% in relation to the control, $p=0.0010$; $t=3.637$). Finally, in the Inhibitory Avoidance test, a significant reduction in the latency time to the dark field (16% compared to control, $p=0.0169$; $F(1,30)=6.396$) was observed in the VPA group.

Conclusion

These results suggest that these animals present anxiety-like behavior, in addition to impairments in mobility, social interaction and long-term memory.

Financial Support

FAPESP, CAPES and CNPq

KLOTHO-HYPOMORPHIC MICE SHOW SEX-BASED REDUCED EXPRESSION OF AMPAR AND CHANGES IN Na, K-ATPase ACTIVITY IN THE CEREBELLUM

Santos, G. R. O.; Possebom, I. R.; Kawamoto, E. M., Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introduction and Objectives

Aging is characterized by a functional decline in several physiological systems. Klotho participates in some signaling pathways involved in aging, such as Wnt and p53, and in the regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. Klotho-hypomorphic mice ($Kl^{-/-}$) exhibit accelerated aging and cognitive decline. Glutamatergic signaling is important for synaptic plasticity, since N-methyl-D-aspartate (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors participate in long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD). The Na^+ , K^+ -ATPase (NaK) pump regulates cell membrane potential and participates in neurotransmitter signaling, and in pathways associated with spatial learning. Therefore, the objective was to investigate the expression of glutamatergic receptors and NaK isoforms activity in the cerebellum and hippocampus of male and female $Kl^{-/-}$ mice.

Methods and Results

$Kl^{-/-}$ and wild-type ($Kl^{+/+}$) male and female mice ($n = 7$; 8 week-old) were euthanized and cerebellum and hippocampus were collected, after genotyping the animals through conventional PCR. Western Blotting assays were performed to investigate the protein expression of the subunits GluN1 (NMDA) and GluA1 (AMPA), using β -actin as an internal control. For total protein extraction, the tissues were homogenized using RIPA buffer and protease and phosphatase inhibitors. For NaK activity assay, the tissues were processed using a homogenization buffer. Each sample was used in three distinct tubes containing histidine buffer, adenosine triphosphate (ATP), and different concentrations of ouabain (3 μ M or 3 mM), a NaK inhibitor, to determine α 1 and α 2/3 isoforms and total ATPase activities (NaK-ATPase and Mg^{2+} -ATPase). To determine the absorbance of the samples, the quenching solution (0.5% ammonium molybdate) and the colorimetric reagent Fiske-Subarow were added. Data was statistically analyzed by unpaired Student's t-test, Two-way ANOVA, and Tukey's multiple comparisons. Differences are considered significant for $p < 0.05$. In the cerebellum, $Kl^{-/-}$ male mice show reduced expression of GluA1 (AMPA) compared to $Kl^{+/+}$ male (51% of reduction; $F(1,22) = 4.862$; $p = 0.0082$) and $Kl^{-/-}$ female (51% of reduction; $F(1,22) = 9.391$ for interaction; $p = 0.0079$). No differences were observed in the expression of GluA1 in the hippocampus or GluN1 in the both regions. Also, $Kl^{-/-}$ male mice show reduced α 2/3-NaK activity compared to $Kl^{+/+}$ male in the cerebellum ($t, df = 3.136, 8$; $p = 0.0139$), but not in the hippocampus, while $Kl^{-/-}$ female mice show reduced Mg^{2+} -ATPase activity in the cerebellum ($t, df = 3.340, 12$; $p = 0.0059$). The project is approved by the Ethics in the Use of Animals Committee (CEUA 8613021222).

Conclusions

The findings suggest that Klotho could influence the expression of AMPA receptor and the activity of NaK-ATPase in the cerebellum in a sex-dependent manner. Therefore, Klotho deficiency may result in sex-specific alterations in AMPAR expression and NaK-ATPase activity, which may contribute to the cognitive decline found in these animals. Financial support This work was financially supported by FAPESP (2022/13804-0), CAPES and CNPq.

EVALUATION OF POLYELECTROLYTE NANOPARTICLES OF CHITOSAN AND HYALURONIC ACID AS TOPICAL DELIVERY SYSTEMS FOR CYTOTOXIC AGENTS

Hirokawa, C. M., Passos, J. S., Nunes, J. R., Lopes L. B., Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction and Objectives: Polyelectrolytes can form complexes spontaneously through electrostatic interactions. Considering the simple and low-cost process, as well as good biocompatibility and low toxicity, polyelectrolyte complexes (PECs) have been employed as drug nanocarriers. This project proposed the development of polyelectrolyte nanoparticles composed of hyaluronic acid (HA) and chitosan (CS), aiming to obtain a bioadhesive topical formulation for skin cancer treatment.

Methods and Results: PECs were developed by adding HA dropwise to CS under stirring, varying polymer concentration, homogenization method, and type of surfactant/cosolvent. Selected PECs were obtained at a 1:1 (w/w) ratio of polyelectrolytes (0.25% w/w each) and probe sonication, displayed nanometric size (209nm, PDI=0.19), and cationic zeta potential (+28mV). PECs presented bioadhesive potential, demonstrated by shifts in size and zeta potential upon incubation with mucin, and reduced transepidermal water loss. Paclitaxel (PTX) and 5-fluorouracil (5-FU), cytotoxic drugs with distinct physical-chemical characteristics, were incorporated at 0.25 and 0.75%, respectively; propylene glycol addition was necessary for PTX incorporation. Compared to the control, 2.3- and 4.5-fold ($9.4\pm 3.6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $2.8\pm 0.8\mu\text{g}/\text{cm}^2$) increases in PTX penetration into the stratum corneum and viable skin layers, respectively, were observed after 12h. No increase in 5-FU penetration was demonstrated. Incorporation in PECs resulted in slight increases in the cytotoxicity of drugs against SK-MEL-147 melanoma cells, reducing IC_{50} by 1.5- and 1.2-fold (1.55 and 35.10 μM for respective PTX and 5-FU) compared to control solutions. IC_{50} values found for keratinocytes (HaCat) were higher (5.74 and 162.6 μM for respective PTX and 5-FU). At non-cytotoxic concentrations, drug-loaded PECs promoted 24-31% reductions on cell migration, suggesting that drug incorporation in PECs did not hinder their biological effects.

Conclusions: We have developed and optimized bioadhesive PECs based on CS and HA, and compared their ability to incorporate, promote cutaneous delivery and cytotoxicity of drugs with different characteristics. An improved penetration into deeper skin layers of PTX was observed. Although PECs mediated only a discrete reduction in IC_{50} values of drugs compared to drug solutions, incorporation in PECs might allow PTX delivery as an aqueous dispersion, avoiding the use of nonpolar agents of higher toxicity. This could potentially enable the use of this hydrophobic drug in topical therapies for skin cancer.

Financial support: FAPESP (#2020/01208-8;#2018/13877-1;#2021/06755-0;#2021/12658-7); CNPq (306866/2020-0;307928/2023-3) and CAPES (finance code 001).

MODELO MURINO DE DOENÇA DE PARKINSON APRESENTA PREJUÍZO DO DESPERTAR EM RESPOSTA À HIPERCAPNIA. Aquino¹, Y.C.; Miranda¹, N.C.; Oliveira³, L.M.; Moreira², T.S.; Ramirez³, J.M.; Takakura¹, A.C., ¹Departamento de Farmacologia e ²Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; ³Center for Integrative Brain Research, Seattle Children's Research Institute.

Introdução e objetivos: A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN). Pacientes com DP apresentam sintomas clássicos e não clássicos, como déficits respiratórios e distúrbios do sono. O despertar, especialmente durante o sono, é crucial para manter a homeostase e responder a desafios ambientais, como altos níveis de CO₂. Sabe-se que o modelo animal de DP induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) apresenta redução da frequência respiratória basal durante o sono além da degeneração de áreas importantes para a quimiorrecepção central e controle respiratório, como o núcleo retrotrapezóide (RTN). Assim, nosso objetivo foi investigar potenciais mudanças no processo de despertar induzido pela hipercapnia no modelo de DP.

Métodos e resultados: Camundongos adultos C57BL/6 e Vglut2Ai6 (N=29; CEUA: 6641200919; 8760150318) receberam injeções bilaterais de veículo ou 6-OHDA no estriado. Após dez dias, gravações de eletroencefalograma e eletromiografia foram conduzidas em um grupo de animais para avaliar o despertar em resposta à hipercapnia (7% CO₂) durante o sono. Enquanto isso, outro grupo foi exposto a um estímulo de hipercapnia (3 horas) para avaliar a ativação neuronal em regiões relacionadas à quimiorrecepção central. Nossos achados revelaram uma redução de 77% no número de neurônios dopaminérgicos da SN de camundongos que receberam 6-OHDA (87,1 ± 15,8 vs. sham 380,5 ± 29,7 neurônios, p < 0,0001). Além disso, os animais DP mostraram uma redução de 40% dos neurônios glutamatérgicos ativados no RTN (15,4 ± 4 vs. sham 25,6 ± 3,1 neurônios, p < 0,0001) e de 34% dos neurônios orexinérgicos ativados no hipotálamo lateral (129,7 ± 30,7 vs. sham 196,2 ± 32,3 neurônios, p = 0,0044). Entretanto, esses animais apresentam aumento de 36% e 73% nos neurônios glutamatérgicos ativados no núcleo do trato solitário (236,2 ± 22,9 vs. sham 173,5 ± 10,7 neurônios, p = 0,0001) e no núcleo parabraquial lateral externo (36,7 ± 3,6 vs. sham 21,2 ± 4,1 neurônios, p < 0,0001), respectivamente. Esses animais também mostraram um atraso de 45% no despertar em condições de hipercapnia em comparação com animais controle durante o sono sem movimento rápido dos olhos (137,5 ± 37,0 vs. sham 95,0 ± 31,9 segundos, p < 0,0001) e um aumento de 40% do nível limite de CO₂ necessário para o despertar (6,0 ± 1,2 vs. sham 4,3 ± 1,5%, p < 0,0001).

Conclusão: Portanto, nossos dados sugerem um possível comprometimento da fisiologia do despertar em animais com DP induzida por 6-OHDA.

Apoio financeiro: FAPESP, CNPq, CAPES-PROEX, NIH.

NADPH OXIDASE, APOCYNIN, AND ITS EFFECTS ON APOPTOTIC AND SURVIVAL PATHWAYS IN THE 6-OHDA RAT MODEL OF PARKINSON'S DISEASE. Pedrão, L. F. A. T., Medeiros, P. O. S., Santos, E. C. L., Falquetto, B., Institute of Pharmacology - USP

Introduction and objective: Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by the death of dopaminergic neurons in the Substantia Nigra (SN). It presents motor symptoms, such as dyskinesia, postural instability and respiratory problems. It is known that the 6-OHDA animal rat model presents neurodegeneration in respiratory control regions such as nucleus of solitary tract (NTS), retrotrapezoid nucleus (RTN), preBötzinger complex (preBötC) and rostral ventral respiratory group (rVRG), which causes loss in ventilatory function. Oxidative stress seems to be the main cause of this impairment in breathing and previous work have shown that apocynin (APO) prevented respiratory nuclei degeneration and breathing dysfunction in PD model. Aim: Evaluate the effects of the treatment with APO on NOX expression and in the death and survival signaling of respiratory nuclei and respiratory deficits in 6-OHDA animals. Our objective is to evaluate the effects of the treatment with APO on NOX expression and in the death and survival signaling of respiratory nuclei and respiratory deficits in 6-OHDA animals.

Methods and results: 6-OHDA (24 μ g/ μ l) or vehicle was injected into male adult rat's striatum. Animals were treated with APO in drinking water for 10 days, starting on the 20th day after PD induction. On the 30th day, the animals were euthanized, their brains were sliced in microtome, and their brainstem was dissected to extract respiratory neurons and perform Western Blot. All animals were submitted to tyrosine hydroxylase (TH)-immunoreactivity (ir) to evaluate SN and confirm PD model. Two-way ANOVA followed by Newman Keuls post-hoc was applied with $p < 0.05$. Our results showed that 6-OHDA reduced TH+ neurons in SN and APO did not reverse it as expected, confirming the PD model (vehicle: $755,49 \pm 141,55$; 6-OHDA: $207 \pm 62,24$; vehicle + APO: $711,43 \pm 97,52$; 6-OHDA + EX: $210,75 \pm 80,63$ neurons, $F_{1,26} = 213,7$, $p < 0.0001$). Our ELISA protocol showed a reduction NOX2 expression of the rVRG + preBotC nuclei in the 6-OHDA group, and treatment with APO prevented it (Vehicle: $0,2768 \pm 0,0711$; 6-OHDA: $0,4060 \pm 0,0647$; Vehicle + APO: $0,2284 \pm 0,0686$; 6-OHDA + APO: $0,2960 \pm 0,0723$, $F_{1,13} = 0,8363$, $p = 0,0119$, $F_{1,13} = 5,517$, $p = 0,0353$), but not in the RTN (Vehicle: $0,2027 \pm 0,0808$; 6-OHDA: $0,1925 \pm 0,0757$; Vehicle + APO: $0,1876 \pm 0,0426$; 6-OHDA + APO: $0,2592 \pm 0,0582$, $F_{1,21} = 1,316$, $p = 0,2643$). Also, in the rVRG + preBotC, we saw alterations in the expression of Akt1, GSK3 β -p (Ser9), and GSK3 β , which were prevented by the treatment with APO ($p < 0,05$). Finally, in the RTN, we saw altered expression of Bcl-2, GSK3 β and β -catenin, with prevention after treatment with APO ($p < 0,05$).

Conclusion: Survival signaling is important in the respiratory neurodegeneration in 6-OHDA model, and treatment with APO can prevent it, revealing that NOX2 is valuable in the neurodegeneration of respiratory nuclei in the 6-OHDA model.

Financial Support: CAPES - 88887.940799/2024-00; FAPESP - 2019/00065-1; 2021/12538-1

EFFECTS OF EXPOSURE TO PHYSICAL ACTIVITY IN MALE SWISS MICE TREATED WITH ETHANOL DURING LACTATION AND ADOLESCENCE.

CIRINO, L. S. M., MARENGO, L., MARIANNO, P., CAMARINI, R.

Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introduction and objectives

The third trimester is a critical period of brain growth, analogous to postnatal days 1 to 10 in rats, making it highly vulnerable to ethanol effects on neurodevelopment. Ethanol exposure during this period can lead to reduced neurogenesis and adverse behavioral outcomes. Neonatal ethanol exposure sensitizes the brain to subsequent ethanol exposure in adolescence, affecting behaviors that vary from increased to reduced ethanol drinking, depending on the exposure's duration. Behavioral sensitization, characterized by an augmented response to repeated stimuli, is a hallmark of ethanol-induced neuroadaptation.

Although a direct link between behavioral sensitization and addiction remains unconfirmed, evidence suggests shared neurocircuitry in both sensitization and relapse. Physical activity has emerged as a potential modulator of neurobehavioral outcomes, with running wheel exposure influencing ethanol-induced rewards. Access to running wheels can alleviate negative affective behaviors associated with ethanol withdrawal. This study aims to investigate the effects of neonatal ethanol or saline treatment followed by voluntary running wheel access on behavioral sensitization to ethanol during adolescence.

Methods and results

A factorial design was employed, with male Swiss mice derived from six litters. Mice were housed in groups with food and water ad libitum. Experiments were conducted following ethical guidelines, with ethanol administered intraperitoneally during postnatal days 4 to 9. On postnatal day 21, pups were weaned and assigned to groups: Saline-Sedentary; Saline-EE; Ethanol-Sedentary; and Ethanol-EE. Half of the mice had access to running wheels until the behavioral sensitization protocol's completion. Locomotor activity was assessed in an open field arena. Initially, animals were

habituated to injections and the open field for two days. Behavioral sensitization consisted of a locomotor sensitization phase followed by a withdrawal period and a test day to evaluate sensitization expression.

The ANOVA revealed significant interactions between neonatal treatment, housing conditions, and assessment days, indicating that environmental enrichment affected motor activity. Mice exposed to environmental enrichment showed lower motor activity compared to controls, suggesting that physical activity may mitigate the neurobehavioral effects of early ethanol exposure. This version maintains the essential details while fitting within the character limit.

Conclusion

The results of this study suggest that exposure to ethanol during the neonatal period and adolescence, combined with voluntary physical activity, can modulate the effects of behavioral sensitization to ethanol in male Swiss mice. Neonatal ethanol exposure followed by voluntary physical activity during adolescence appears to have an attenuating effect on behavioral sensitization to ethanol, with animals exposed to this combination showing a reduced locomotor response to ethanol compared to controls. These findings provide insights into potential therapeutic interventions to mitigate the long-term consequences of early-life ethanol exposure.

Finance Support:   

INVESTIGAÇÃO DO IMPACTO PROGNÓSTICO DAS PIP4K2S E SUA TOXICIDADE FARMACOLÓGICA NO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Carvalho, M.F.L., Lima, K., Machado-Neto, J.A., Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: O carcinoma hepatocelular é o quinto tipo de câncer mais comum e uma das principais causas de morte relacionada ao câncer no mundo. A família PIP4K2s é composta por três quinases lipídicas que desempenham um papel significativo na proliferação celular, sobrevivência, captação de glicose e organização do citoesqueleto, todos processos relatados como desregulados no câncer. Desta forma, o objetivo deste projeto é investigar o impacto da expressão de PIP4K2s sob os desfechos de sobrevida, características clínicas e funções biológicas em pacientes com carcinoma hepatocelular da coorte TCGA e caracterizar o potencial antineoplásico de sua inibição farmacológica, em linhagens celulares derivadas de hepatocarcinoma.

Métodos e Resultados: Foram utilizados dados de sequenciamento de RNA, características e desfechos clínicos de pacientes com hepatocarcinoma depositados no cBioPortal for Cancer Genomics. Os transcritos de RNAseq das coortes do TCGA foram pré-classificados de acordo com sua expressão diferencial, comparando amostras com alta e baixa expressão das PIP4K2s. A sobrevida global, a sobrevida livre de doença e a sobrevida livre de progressão da coorte TCGA foram investigadas pelo modelo de regressão de Cox. A análise de enriquecimento gênico (GSEA) foi realizada para identificar as vias de sinalização relacionadas à expressão de PIP4K2s. $FDR < 0.25$ e $p \text{ valor} < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foram cultivadas células derivadas de carcinoma hepatocelular (HepG2 e Huh-7), em meio de cultura recomendado pela ATCC para análises *in vitro* de viabilidade celular (ensaio de MTT) e clonogenicidade (ensaio de formação de colônias marcadas com cristal violeta).

Os resultados obtidos indicaram que os PIP4K2s são mais expressas no tecido tumoral em comparação com o tecido normal adjacente. A alta expressão de PIP4K2s indicou piores desfechos clínicos em pacientes com carcinoma hepatocelular. Na análise GSEA, vários eventos celulares e moleculares foram enriquecidos positivamente de acordo com a expressão de PIP4K2s, dos quais destacamos a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, essencial para o crescimento e necessidades celulares. Nas linhagens celulares de carcinoma hepatocelular tratadas com inibidores de PIP4K2s, houve redução na viabilidade celular e na formação de colônias.

Conclusão: Os resultados obtidos fornecem evidências promissoras de que as PIP4K2s podem ser um potencial marcador prognóstico e alvo molecular para o carcinoma hepatocelular. Esta identificação abre caminho para o desenvolvimento de futuros ensaios clínicos que explorem a eficácia deste inibidor em pacientes com esta patologia.

Apoio Financeiro: FAPESP (2023/12969-8).

SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA-3 PREVINE ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS FUNCIONAIS E NEUROANATÔMICAS EM UM MODELO MURINO DA DOENÇA DE PARKINSON

Macedo, T.O.¹, Miranda, N.C.¹, Cabral, L.M.¹, Moreira, T.S.² e Takakura, A.C.¹

¹Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

² Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo caracterizado pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra (SN), o que leva aos sintomas clássicos. Além desses sintomas, temos a presença de alterações respiratórias que estão potencialmente associadas à degeneração neuronal na coluna respiratória ventral (VRC) do bulbo encefálico. Essa degeneração pode ser desencadeada pelo aumento do estresse oxidativo e da neuroinflamação na VRC. Portanto, este estudo tem como objetivo investigar o potencial dos ácidos graxos ômega-3, conhecidos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, em aliviar as alterações respiratórias em um modelo animal de DP.

Métodos e Resultados

Camundongos machos adultos (linhagem C57BL/6, CEUA nº 8760150318) receberam injeções bilaterais de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ou veículo no estriado para induzir o modelo de DP. Cinco dias após a injeção, os camundongos foram tratados com ômega-3 (85 mg/kg/dia, por 10 dias por gavagem) ou veículo. Em seguida, os parâmetros respiratórios foram medidos usando pletismografia de corpo inteiro, e a imunohistoquímica foi realizada para avaliar a neurodegeneração e a neuroinflamação na SN e em regiões específicas da VRC: Complexo preBötzing (preBötC) e núcleo retrotrapezoide (RTN).

Como esperado, os animais que receberam 6-OHDA apresentaram uma redução de 75% dos neurônios dopaminérgicos da SN ($72 \pm 5,42$ vs. veículo: $302 \pm 4,16$ neurônios), 16% de redução na densidade do receptor neurocinina-1 (NK1r) no preBötC ($26 \pm 1,07\%$, vs. veículo: $31 \pm 1,32\%$ de densidade) e 38% de redução nos neurônios que expressam phox2b no RTN ($30 \pm 2,85$ vs. veículo: $48 \pm 1,32$ neurônios). Além disso, houve uma diminuição de 37% na densidade de astrócitos no RTN ($19 \pm 1,91$, vs. veículo: $30 \pm 0,91\%$ de densidade) e uma diminuição de 17% na densidade das células microgliais na VRC ($0,052 \pm 0,001$, vs. veículo: $0,063 \pm 0,002\%$ de densidade celular). Adicionalmente, foi observada uma diminuição na frequência respiratória em repouso ($161 \pm 4,3$ vs. veículo: $183 \pm 8,4$ respirações/min). O tratamento com ômega-3 preveniu a degeneração de NK1r no preBötC ($29 \pm 0,71\%$ de densidade), dos neurônios phox2b no RTN ($45 \pm 2,98$ neurônios), assim como a densidade de astrócitos ($24 \pm 1,81\%$ de densidade) e microglia ($0,062 \pm 0,003\%$ de densidade celular). O tratamento com ômega-3 também foi capaz de melhorar a disfunção respiratória ($185 \pm 9,7$ respirações/min).

Conclusão

Nossos achados destacam o potencial do tratamento com omega-3 em atenuar as mudanças respiratórias observadas em um modelo experimental de DP.

Apoio Financeiro: FAPESP, CNPq e CAPES-PROEX

ESTUDO DE SISTEMAS DE PECTINA-QUITOSANA ENRIQUECIDOS COM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS PARA A LIBERAÇÃO DE SINVASTATINA E ADENOSINA VISANDO O TRATAMENTO DE ÚLCERAS CUTÂNEAS.

Rocco V.M.¹, Daré R.G.¹, Lopes L.B.¹

¹*Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil*

Introdução e Objetivos: O aumento da incidência de lesões de difícil cicatrização devido ao envelhecimento populacional e à prevalência de doenças crônicas como o diabetes exige a busca constante por novas estratégias de tratamento que combinem baixo custo e boa eficácia. Nesse contexto, foi desenvolvido um hidrogel à base de pectina e quitosana, contendo carreadores lipídicos nanoestruturados para a liberação de sinvastatina e adenosina (CLN-S/A), como uma nova abordagem para a cicatrização de feridas. **Métodos:** Foram desenvolvidas formulações de hidrogel contendo pectina e quitosana com diferentes proporções de CLN-S/A. A otimização envolveu os seguintes parâmetros: velocidade e tempo de agitação dos polímeros, concentração de quitosana e pectina, e modo de incorporação de CLNs no hidrogel. Os sistemas foram submetidos a estudos de estabilidade acelerada e em tempo real, além da caracterização do perfil reológico, taxa de intumescência e perfil de liberação *in vitro*. **Resultados:** Para a formação de um hidrogel estável foi necessário o uso de ultra-turrax a 10.900 rpm por 10 minutos, com concentrações de 1,5% de quitosana e 2,5% de pectina. A incorporação de CLNs ao hidrogel foi estudada comparando duas abordagens: CLNs em dispersão e CLNs liofilizados. A abordagem com CLNs liofilizados resultou em hidrogéis homogêneos e estáveis. As formulações com 50% e 100% de CLNs apresentaram viscosidade significativamente maior em comparação com o hidrogel com 20% de CLNs, sendo essas duas formulações selecionadas para experimentos subsequentes. No teste de estabilidade acelerada, apenas o hidrogel sem nanopartículas apresentou separação de fases. A avaliação de estabilidade em tempo real revelou que todos os hidrogéis mantiveram comportamento pseudoplástico e valores constantes de pH. Na avaliação da taxa de intumescimento, o hidrogel sem nanopartículas apresentou uma taxa maior em comparação com o hidrogel contendo nanopartículas este, porém, demonstrou capacidade significativa de absorção de água. Além disso, a formulação apresentou perfil de liberação *in vitro* modificado, com taxas de liberação de sinvastatina e adenosina menores do que dos fármacos livres. **Conclusão:** A otimização das formulações, considerando a concentração de polímeros e a forma de incorporação das nanopartículas, permitiu obter sistemas com propriedades reológicas adequadas, com capacidade de intumescimento e modulação do perfil de liberação dos fármacos, com potencial para prolongar a ação terapêutica no local da lesão.

Palavras-chave: Hidrogel, nanopartículas, úlcera cutânea

Agradecimentos: Os autores agradecem o financiamento da FAPESP (2018/13877-1 e 2022/12876-7), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Tecnológico (CAPES) (001), e CNPq (PIBIC).

Avaliação dos efeitos do exercício físico na cognição de animais com deleção da PTEN em neurônios

Andreotti DZ¹, Mello NP¹, Paixão AG¹, Almeida OP¹, Scavone C², Orellana AM¹, Kawamoto EM¹

1. Laboratório de Neurobiologia Molecular e Funcional
 2. Laboratório de Neurofarmacologia Molecular
1. e 2. Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Biomédicas- USP

Introdução. A PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) possui estudos relacionados à tumorigênese, proliferação, sobrevivência, migração celular e plasticidade sináptica no sistema nervoso central (SNC). Alterações nesta via associam-se a patologias do SNC, como desordens do espectro autista, esquizofrenia, dentre outras. Fatores ambientais, como o exercício físico, já foram demonstrados como moduladores positivos da resposta cognitiva. O advento do uso de camundongos nocautes condicionados da PTEN é uma interessante ferramenta de estudo de suas funções fisiológicas, possibilitando uma intervenção tecido- e tempo-específicas.

Objetivos. Avaliar, sob o ponto de vista bioquímico e funcional, os efeitos do exercício físico sobre as vias de sinalização associadas ao aprendizado e à memória, que podem ser modulados pela PTEN, contribuindo para um melhor entendimento do potencial uso do exercício físico como estratégia para prevenção e/ou tratamento de patologias relacionadas ao SNC.

Métodos. Fêmeas de camundongos da linhagem *Pten*^{loxP/+}; *Nse-Cre*⁺ foram submetidas a 10 dias de exercício voluntário [grupos experimentais: selvagem sedentária (WT S; n=10), selvagem exercício (WT E; n=10), heterozigoto sedentária (HT S; n=9) e heterozigoto exercício (HT E; n=9). Após esse período foram realizados testes comportamentais (campo aberto, labirinto em cruz elevado, comportamento social e esQUIVA inibitória). Ao fim dos testes os animais foram eutanasiados e o córtex frontal utilizado para estudo da expressão de AKT, p-AKT, NR1, p-NR1, NR2B, PTEN, sinaptofisina, S6 e p-S6.

Resultados. Nos testes comportamentais, os animais exploraram o aparato do campo aberto de forma semelhante. No labirinto em cruz elevado, todos os grupos exploraram mais os braços fechados do aparato. Na interação social, foi avaliada a interação com o animal familiar/desconhecido e o grupo WT S apresentou uma maior interação com o novo animal, enquanto o grupo HT S mostrou uma menor interação com ele. Em relação à esQUIVA inibitória, todos os animais lembraram-se do estímulo aversivo após 24h. No western blotting, revelou-se que o exercício reduziu a fosforilação da proteína S6 e aumentou a expressão do receptor NR1 nos animais HT E.

Conclusão. Neste estudo observamos que 10 dias de exercício voluntário não induziram alterações na memória aversiva e na sociabilidade nos animais HT E, porém o mesmo protocolo foi capaz de alterar a expressão de proteínas relacionadas à cognição, como o receptor NR1.

Apoio Financeiro: Fapesp (processo n. 2016/22996-9).

Publicado em 2023: <https://doi.org/10.36922/an.0872>

EFFECTS OF LIPID NANOPARTICLES CO-LOADED WITH FENRETINIDE AND PERILLYL ALCOHOL ON BREAST CANCER MONOLAYERS AND SPHEROIDS

Malagó, I. D.; Machado-Neto, J. A.; Lopes, L. B.

Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences - USP

Introduction and objective

Chemoprevention is a key strategy in preventing breast cancer recurrence. Fenretinide (Fen) and perillyl alcohol (POH) have shown promise due to their chemopreventive properties. However, their high lipophilicity and systemic side effects limit their use. To address this, we developed nanostructured lipid carriers (NLCs) to co-encapsulate Fen and POH for local subcutaneous administration in mammary tissue, aimed at breast cancer chemoprevention. In this study, the NLC effects were evaluated on breast cancer monolayers and spheroids.

Methods and results

The NLCs had an average size of 279.8 ± 16.1 nm and zeta potential of -22.3 ± 2.9 mV, which were characterized using dynamic and electrophoretic light scattering. The cytotoxicity of co-encapsulated drugs was assessed using MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, and viability was evaluated after 24-48 hours of treatment using the MTT assay for monolayers, and CellTiter Glo® and double staining with propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 dye for spheroids. Co-encapsulating POH (1%) and Fen (0.5-1%) reduced the formulation IC_{50} compared to Fen alone in both MCF-7 and MDA-MB-231 monolayers (5.6- and 1.5-fold, respectively, 48 hours of treatment). Increasing Fen concentration from 0.5% to 1% further enhanced this effect (1.6- and 1.3-fold). In spheroids, encapsulating 1% Fen with POH resulted in a more pronounced effect (3.1-fold), highlighting the importance of model complexity. PI fluorescent signal in MCF-7 spheroids increased after treatment with NLCs co-encapsulating POH and Fen (at 1%) and a Fen solution, but not with unloaded NLCs, suggesting increased cell death. The influence of treatment with non-cytotoxic NLC concentrations (1.3-2.2 mg/mL) on MCF-7 spheroid growth rate (measured for 10 days) and MDA-MB-231 cell migration (24 h treatment) across transwell inserts was also assessed. Migrated cells were stained with crystal violet and counted under an optical microscope using the ImageJ software. NLCs containing 0.5% Fen failed to reduce MCF-7 spheroid growth and MDA-MB-231 cell migration compared to unloaded NLCs.

Conclusion

Viability assays in both monolayers and spheroids indicated that co-encapsulation of POH and Fen is more effective than Fen alone. Increasing Fen concentration from 0.5% to 1% improved the NLC cytotoxicity, especially in the spheroid model. However, non-cytotoxic concentrations of the nanocarrier containing 0.5% Fen did not reduce spheroid growth rate or cell migration.

Financial support

Financial support was received from CAPES (001), CNPq, INCT Nanofarma and FAPESP (2022/00997-4, 2018/13877-1).

PROTEIN DISULPHIDE ISOMERASE A1: A NEW THERAPEUTIC TARGET IN THE RESISTANCE AND PROGRESSION OF MELANOMA.

Da Mota A.N., Beyerstedt, S., Franco, M., Parducci N., Machado-Neto, J.A. and Lopes L.R., Institute of Biomedical Sciences, Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences-USP

Introduction and Objectives: Melanoma is the most aggressive form of skin cancer and has the worst prognosis due to its great metastatic potential and resistance to current chemotherapy. Half of the patient's tumors have the BRAF V600E mutation and develop resistance to the BRAF inhibitor vemurafenib (iBRAF), causing tumor recurrence after six months. Protein disulfide isomerase A1 (PDIA1) is a multifunctional thiol oxidoreductase protein involved in thiol disulfide exchanges in native ER proteins. Cell surface PDI (csPDI) is also highly expressed on the surface of melanoma cells and coordinates complex redox signaling pathways involved in tumor progression, such as the regulation of cytoskeletal organization. Targeting redox regulated signaling pathways may represent a new approach in the treatment of melanoma. Here we investigated the role of PDI in melanoma progression and resistance to BRAF inhibitors. **Methods:** Native human primary melanoma cells A375 and the vemurafenib-resistant cell line A375R were treated for 48 hours with quercetin-3-rutinoside (Rutin, 100 μ M), a csPDI inhibitor, in monotherapy or combined with the iBRAF (3 and 6 μ M). Colony formation was analyzed after 10 days and proliferation after 48 hours. Next, we assessed PDIA1 gene expression from 27 benign nevus and 51 primary human melanomas (GSE98394) and from 103 primary and 369 metastatic human melanoma samples obtained from the TCGA Interim Study (cBioPortal). **Results:** The csPDI inhibitor decreased the number of colonies only in resistant cells. Combining the rutin inhibitor csPDI with iBRAF decreased colony numbers and sensitized iBRAF-resistant cells. The combination of this inhibitor and iBRAF (3 μ M) resulted in A375R decreased cell survival compared to rutin monotherapy. In melanoma patients, PDIA1 mRNA levels were higher in primary melanoma compared with benign nevus ($p < 0.05$) and PDIA1 expression was increased in metastatic melanoma samples compared with primary melanoma samples ($p < 0.05$). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) highlighted that PDIA1 expression positively correlated with glycolysis, UV response and Reactive Oxygen Species (ROS) pathways ($p < 0.05$; FRD < 0.25). **Conclusion:** Inhibition of cell surface PDI decreased colony formation and proliferation of resistant melanoma cells to iBRAF. Furthermore, PDIA1 expression correlated with tumor progression since its expression was lower in nevus and higher in primary and metastatic melanoma. Therefore, we propose that PDIA1 may represent a new therapeutic target to treat resistance to BRAF inhibitors and tumor progression in melanoma patients. **Financial support:** Redoxoma FAPESP n^o 2013/07937-8 and CAPES n^o 88887.807628/2023-00.

SERINIQUINONA COMO PROMISSOR TRATAMENTO DO MELANOMA RESISTENTE

Hirata, A.S.^{1,2}, Carvalho, L.A.C.², Kinker, G.S.³, Rezende-Teixeira, P.¹, Machado-Neto, J.A.¹, Jimenez, P.C.⁴, Santelli, G.M.M.⁵, La Clair, J.J.⁶, Maria-Engler, S.S.², Fenical, W.⁷, Costa-Lotuf, L.V.¹

¹Dpto Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP; ²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; ³A.C. Camargo Cancer Center; ⁴Instituto de Ciências do Mar, UNIFESP; ⁵Dpto Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biomédicas, USP; ⁶Dpto Química e Bioquímica, Universidade da Califórnia, EUA;

⁷Scripps Institution of Oceanography, Universidade da Califórnia, EUA.

Introdução e Objetivos O melanoma é o câncer de pele mais agressivo devido ao seu alto índice de metástase e resistência à quimioterapia convencional, que ainda carece de tratamentos eficazes. Seriniquinona (SQ), originalmente um metabólito de bactéria marinha, destacou-se pela seletividade para células de melanoma e por ter a dermicidina (DCD) como um novo alvo molecular indutor de apoptose via autofagia (Trzoss, *LT. Proc. Nat. Acad. Sci.* v. 111, p. 14687, 2014). Resultados anteriores mostraram a SQ promovendo morte celular por diferentes sinalizações autofágicas e apoptóticas, independente da mutação do melanoma (Hirata *AS. Mol.*, v. 26, p. 7362, 2021). Assim, o presente estudo tem o objetivo de desvendar o mecanismo de ação da SQ como uma nova terapia para o melanoma, além de utilizá-lo como nova ferramenta farmacológica para entender o papel da DCD na sobrevivência, metástase e resistência.

Métodos e Resultados Linhagens celulares de melanoma parental (SK-MEL-28) e resistente ao vemurafenibe (SK-MEL-28R) foram usadas como modelos. A citotoxicidade foi caracterizada por MTT e ensaios clonogênicos. A pele humana reconstruída *in vitro* foi utilizada para mimetizar um modelo *in vivo* de invasão do câncer. RNA-seq de amostras de pacientes (banco de dados públicos) e de nossas células tratadas com SQ foram analisados por bioinformática e os efeitos foram validados por western blot e ensaios de adesão. A SQ teve IC₅₀ de 0,8 µM para SK-MEL-28 e 2,3 µM para SK-MEL-28R, com uma notável redução na clonogenicidade. Tumores de ambas as linhagens foram crescidos na pele e apresentaram redução no tamanho e na invasão da derme; em contraste, não houve sinais tóxicos em tecidos saudáveis. A transcriptômica mostrou a ativação do estresse do retículo endoplasmático, validada em ambas as linhagens pela superexpressão das proteínas GRP78, p-eIF2α e XBP1s. A DCD já foi vista ligada à GRP78 modulando a migração por Wnt/β-catenina; especialmente para SK-MEL-28R, o tratamento de 6h diminuiu em 98% da capacidade de adesão; a N-caderina e a β-catenina também foram reduzidas. Análises do banco TCGA com pacientes DCD positivos correlacionam com os efeitos observados no RNA-seq das células tratadas com SQ.

Conclusão A SQ demonstrou potente atividade contra o melanoma, especialmente na resistente. Sua importância como novo candidato a fármaco também reside na segurança para a pele, sugerindo que sua seletividade pode mitigar possíveis efeitos colaterais. A SQ é a única molécula conhecida por ter DCD como alvo, tornando-a uma ferramenta farmacológica útil. Nossos resultados têm apontado consistentemente para interação DCD-GRP78 como reguladores da adesão celular e consequente migração. Assim, nossos achados sustentam que tais proteínas, que apresentam superexpressão em vários cânceres, contribuem para a sobrevivência e metástase do melanoma.

Apoio Financeiro FAPESP (2020/06613-8, 2015/17177-6); CNPq; CAPES.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL SINÉRGICO ENTRE UM NOVO INIBIDOR DE HISTONA

DESACETILASE E A TEMOZOLOMIDA EM LINHAGENS CELULARES DE GLIOBLASTOMA

Gouvêa L.M.¹, Furtado L.C.¹, Costa-Lotufo L.V.¹

Introdução e Objetivos

Gliomas são tumores cerebrais primários destacados entre os mais incidentes no sistema nervoso central. Atualmente a farmacologia disponível para o tratamento da doença se concentra em remoção cirúrgica, seguida de quimioterapia ou radioterapia muito agressivas. A fim de explorar novas estratégias para o tratamento do glioblastoma, o potencial sinérgico entre uma nova substância desenhada a partir do inibidor de histona desacetilase PCI-34051, denominado 3a, e a temozolomida (TMZ), fármaco já utilizado na clínica, foi avaliado por meio de ensaios nas linhagens de glioblastoma U251MG e U87MG.

Métodos e Resultados

O potencial citotóxico das substâncias foi avaliado no ensaio da Sulforodamina B em linhagens celulares de glioblastoma, U87MG e U251MG, e, em seguida, estudaremos os mecanismos envolvidos na ação dessas substâncias, utilizando ensaio clonogênico. Os resultados obtidos a partir do ensaio SRB indicam que a temozolomida tem efeito citostático sobre as células tratadas. Quando observadas as porcentagens de proliferação celular para o tempo de exposição de 24hrs, todas as concentrações avaliadas apresentaram inibição significativa das células U251MG, enquanto que nas células U87MG, somente as concentrações 31,3, 125 e 500 μ M causaram inibição significativa. Assim como observado em 24h, com 48hrs de exposição ao fármaco mostrou resultados significativos para todas as concentrações analisadas na linhagem celular U251MG, apresentando efeito antiproliferativo de 80,3% nas células tratadas com a maior concentração (500 μ M). Para a linhagem U87MG, os tratamentos também mostraram efeito significativos, quando comparados ao controle negativo, com exceção da menor concentração, 15,6 μ M. Para o maior período de exposição analisado, 72hrs, todas as concentrações aplicadas, em ambas as linhagens, mostraram diferenças estatísticas significativas em comparação ao controle negativo. É importante observar que os valores de inibição da proliferação das células U251MG nos tratamentos de 48 e 72h foram muito próximos para todas as concentrações, indicando que o tempo de 48h já apresenta resultados similares ao de 72h, podendo ser reduzida a exposição ao fármaco

Conclusão

Os ensaios de SRB revelaram que a temozolomida exerce um efeito mais pronunciado na inibição da proliferação da linhagem celular U251MG em comparação com a U87MG, destacando a maior sensibilidade das células U251MG ao fármaco em diferentes tempos de exposição.

THE ROLE OF GSK3B IN RESPIRATORY NUCLEI IN PARKINSON'S DISEASE.

Santos, E.C.L.¹; Pedrão, L.F.A.T.¹; Medeiros, P.O.S.¹; Falquetto, B.¹

¹ Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo. São Paulo, Brazil.

Introduction: Parkinson's disease (PD) is a degenerative disease characterized by the loss of dopaminergic neurons in the Substantia Nigra (SN). Its motor symptoms are widely known as bradykinesia and dyskinesia, however it also presents non-classic motor symptoms, such as respiratory dysfunction. In animals injected with 6-OHDA into the striatum, a drug that allows the development of a mimetic model of idiopathic PD, there is a loss of neurons in respiratory nuclei such as the rostral ventral respiratory group (rVRG) and pre-Bötzinger (preBötC) and significant loss of chemosensitive neurons in the retrotrapezoid nucleus (RTN) in mice. Studies demonstrate that oxidative stress is a major mechanism to explain these losses. The presence of free radicals leads to a response from immune cells in the central nervous system (CNS), activating microglia and astrocytes that respond by releasing pro-inflammatory agents that are often toxic to neurons. Evaluating the signaling pathways of this inflammatory response, there is the presence of GSK3- β , glycogen synthase kinase 3 β , which when autophosphorylated on the Tyr216 residue (activated GSK-3 β) has a close relationship with pro-apoptotic pathways. Therefore, its inhibition can protect dopaminergic neurons from the harmful agents of neuroinflammation, and thus can also protect the respiratory nuclei from degeneration in PD.

Aim: To evaluate the participation of GSK-3 β in cell death and survival pathways in the respiratory nuclei in the 6-OHDA model of PD in mice.

Methods: 6-OHDA (10 μ g/ μ l) or vehicle was injected into the striatum of male mice (n=15, ~22g) and after 6 days they were euthanized, and the brainstem was removed and sliced in the microtome. The tissues were dissected, and the respiratory nuclei collected for Western Blot (WB). The mesencephalic region was divided into 30 μ m thick sections, and the tissues underwent tyrosine hydroxylase (TH)-immunoreaction to evaluate the SN to confirm the PD model. Student T test was applied with p<0.05.

Results: 6-OHDA reduced TH+ neurons in SN confirming the PD model (6-OHDA: $143,5 \pm 27,1$ vs. Vehicle: $475,83 \pm 81,8$ neurons, $T_{10}=9,443$; $p>0,0001$). The WB analysis show an increase in GSK3 β in the RTN (6-OHDA: $1,25 \pm 0,14$ vs. Vehicle: $0,86 \pm 0,30$, $T_8=2,375$; $p=0,0449$) and a reduction in rVRG + preBotC (6-OHDA: $0,60 \pm 0,28$ vs. Vehicle: $0,92 \pm 0,30$, $T_{10}=2,362$; $p=0,0398$). Furthermore, analyses showed a reduction in pGSK-3 $\beta^{\text{TyR}216}$ in the rVRG + preBötC nuclei (6-OHDA: $0,67 \pm 0,20$ vs. Vehicle: $1,03 \pm 0,35$; $T_{13}=2,418$; $p=0,0310$), but not in RTN (6-OHDA: $1,53 \pm 0,77$ vs. Vehicle: $1,03 \pm 0,29$; $T_9=1,576$; $p=0,1494$).

Conclusion: The GSK-3 β showed a reduction in its levels in the rVRG + preBötC nuclei and an increase in the RTN after 6 days of PD induction, followed by the reduction also in pGSK-3 $\beta^{\text{TyR}216}$ only in the rVRG + preBotC, which already has a known role in pro-apoptotic pathways. These findings indicate that the GSK-3 β pathway might play a role in the PD' neurodegeneration of respiratory nuclei, with its involvement varying depending on the specific respiratory nuclei and the progression over time.

Financial support: FAPESP (2023/09695-3)

CEUA: 7992180820

Keywords: Neurodegeneration; Respiratory Nuclei; Inflammation; GSK-3 β ; 6-OHDA; Brainstem; Apoptosis.

SÍNDROME SEROTONINÉRGICA EM PACIENTES INTERNADOS EM UM HOSPITAL PSIQUIÁTRICO: INCIDÊNCIA E PROPOSTA DE NOVO ALGORITMO DIAGNÓSTICO

Poian L. R.¹; Chiavegatto S.^{1,2}

¹ Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

² Departamento de Psiquiatria, Instituto de Psiquiatria, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo

Introdução e Objetivos

Nos últimos anos, houve um aumento significativo no uso de antidepressivos e ansiolíticos, gerando preocupação com a síndrome serotoninérgica (SS). A SS é uma reação adversa caracterizada pelo aumento da atividade serotoninérgica, manifestando-se por alterações comportamentais, excitabilidade neuromuscular e instabilidade autonômica. Embora possa variar de formas leves a fatais, a identificação precoce é crucial para evitar complicações graves. No entanto, o diagnóstico da SS é desafiador, dependendo exclusivamente de critérios clínicos. A falta dessa conscientização leva a subdiagnóstico e subnotificação. Os objetivos foram: (a) Compilar lista de fármacos que podem levar à SS; (b) Analisar o uso e correlacionar à incidência da SS em pacientes internados durante um ano; (c) Avaliar quantos pacientes apresentaram sintomatologia pelos critérios de Hunter e Sternbach; (d) Avaliar a detecção da SS pela equipe médica.

Métodos e Resultados

Foram selecionados 44 fármacos que podem causar SS. Analisamos os prontuários de pacientes, internados no Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da USP em 2019, que utilizaram esses fármacos para estabelecer a correlação entre a terapia e a sintomatologia. Usamos a escala de Naranjo para determinar a causalidade. A pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética do ICB (CAAE 30953920.5.0000.5467) e do HCFMUSP (CAAE 30953920.5.3001.0068).

Dos 901 pacientes que receberam algum dos 44 fármacos, 466 (51,7%) tinham prescrições predisponentes à SS. Destes, quatro pacientes foram identificados com SS, resultando em uma incidência de 0,86%. Três foram diagnosticados pelos critérios de Sternbach e um pelos critérios de Hunter; contudo, nenhum foi diagnosticado pela equipe médica. A incidência encontrada difere das relatadas na literatura devido a diferenças metodológicas. Em todos os casos positivos para SS, houve o envolvimento de antidepressivos, antipsicóticos de segunda geração, inibidores dos transportadores de serotonina e do receptor 5-HT_{2A}, além da inibição dos transportadores de noradrenalina e agonismo inverso muscarínico, sugerindo o envolvimento de outros neurotransmissores. Propomos um novo algoritmo para facilitar o diagnóstico, unificando os critérios diagnósticos existentes e utilizando a escala de Naranjo para estabelecer a causalidade.

Conclusões

O estudo revelou que a SS é mais frequente do que se esperava e mesmo em um hospital especializado e de excelência, a SS é subestimada por falta de diagnóstico. Nossa proposta de combinação de critérios e da escala de Naranjo mostrou-se eficaz para aumentar a sensibilidade na detecção da SS. Além dos fármacos e mecanismos conhecidos, outros neurotransmissores, podem estar envolvidos na síndrome. A sintomatologia em alguns pacientes, apesar de condições similares, sugere que polimorfismos que aumentam a serotonina na fenda sináptica sejam fatores de risco a considerar.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

EARLY-LIFE STRESS WORSENS LATE IMPAIRMENT OF AVERSIVE MEMORY EXTINCTION IN STRESSED MALE RATS DURING ADULTHOOD

Albernaz-Mariano, Kairo Alan¹, Pereira, Robbert Mota¹, Munhoz, Carolina Demarchi¹;
¹USP-São Paulo, Dep. de Farmacologia-ICB, PPG em Farmacologia, Brazil

Introduction and Aim

Early-life stress (ELS) has been identified as a risk factor for the late development of several diseases. Various brain structures, including the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex, can be affected, leading to memory impairment. Glucocorticoids (GC), released via the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis), are central mediators of the stress response and play a crucial role in aversive memory formation. Although the effects of GC on the brain are being investigated, the impact of ELS on memory after an acute stressful challenge in adulthood remains poorly understood. We aim to analyze ELS's consequences on aversive memory extinction in male rats acutely stressed in adulthood.

Methods and Results

Male Wistar rat pups were subjected to maternal separation (MS) for 3h daily from PND1 to 14 (n = 14-19 per group) (CEUA-ICB 7618201021), and a non-separated group (nMS) was used as control. During adulthood (PND60), MS and nMS groups were exposed to 2h of stressful restraint challenge (ST), and non-restrained animals (CT) were used as controls. After 10 days, all animals were submitted to contextual aversive conditioning (unconditioned stimulus (US), footshock, 0.5 mA/1s) followed by the aversive memory extinction protocol (6 re-exposures in the conditioned environment), where freezing was evaluated. During contextual aversive conditioning (PND60), the intensity of the US was sufficient to increase freezing and caused aversive memory formation in all groups. The aversive memory formed was extinguished over time in non-stressed animals. Similar to the stressful restraint challenge, ELS late impaired aversive memory extinction. However, MS potentiated the stress effect, further harming fear extinction (*experimental group* [$F_{(3, 54)} = 3.9; p < 0.05$], *time* [$F_{(7, 126)} = 195.9; p < 0.0001$], and *there was an interaction between both* [$F_{(21, 250)} = 3.7; p < 0.0001$]), better observed when comparing freezing during the extinction test between experimental groups (*experimental group* [$F_{(1, 15)} = 8.1; p < 0.05$], *time* [$F_{(1, 15)} = 26.4; p < 0.0001$], and *there was an interaction between both* [$F_{(1, 6)} = 3.4; p > 0.05$]). When analyzing the extinction gain ratio, despite both stresses causing lower gains, their effects were not synergic (*experimental group* [$F_{(3, 54)} = 3.7; p < 0.05$], *time* [$F_{(5, 90)} = 113.9; p < 0.0001$], *without interaction between factors* [$F_{(15, 186)} = 2.2; p > 0.01$]).

Conclusion

Thus, ELS worsens the effects of restraint stress in adulthood, causing late impairment of aversive memory extinction in structures related to HPA axis responsiveness to stress.

Financial Support: USP, CAPES, CNPq, FAPESP (2021/14690-5)

EARLY-LIFE STRESS WORSENS LATE IMPAIRMENT OF AVERSIVE MEMORY EXTINCTION IN STRESSED FEMALE RATS DURING ADULTHOOD

Pereira, Robbert Mota¹, Albernaz-Mariano, Kairo Alan¹, Munhoz, Carolina Demarchi¹;

¹USP-São Paulo, Dpt. de Farmacologia-ICB, PPG em Farmacologia, Brazil

Introduction and Aim

Throughout life, unavoidable exposure to stressful situations can impact brain structures, including the hippocampus and medial prefrontal cortex, leading to memory impairment. Glucocorticoid hormones (GCs), released via the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis), play a pivotal role in stress responses, affecting memory and emotions. Recently, it was observed that early-life stress (ELS), imposed by maternal absence, can worsen the effects of stress challenges in adult offspring. Although the current literature investigates the acute and long-term effects of GC on brain structures, the impact of ELS on memory remains poorly understood in females. This work aims to analyze the impact of maternal separation (ELS) on the stress-induced aversive memory extinction in female rats during adulthood.

Methods and Results

Female Wistar rat pups were subjected to maternal separation (MS group) for 3 hours daily from PND1 to 14 ($n = 14-18$ per group) (CEUA-ICB 7618201021), and a group non-separated (nMS group) was used as control. During adulthood (PND60), MS and nMS groups were exposed to 2h of restraint stress (ST), and non-stressed animals (CT group) were used as controls. After 10 days, all animals were submitted to contextual aversive conditioning (unconditioned stimulus (US), footshock, 0.5 mA for 1 second), followed by the aversive memory extinction protocol (6 re-exposures in the conditioned environment), where freezing was evaluated. The intensity of the footshock caused an increase in fear expression and aversive memory acquisition in all experimental groups. The aversive memory formed was extinguished over time in non-stressed female. Our results demonstrated, for the first time, that both ELS and stressful restraint challenge in adulthood late impaired the aversive memory extinction in female rats. In general, the high sensitivity of females to stress precluded an even more prominent impairment of memory extinction when stresses were associated, suggesting a ceiling effect (*experimental group* [$F_{(3, 51)} = 7.22; p < 0.001$], *time* [$F_{(7, 119)} = 131.60; p < 0.0001$], and *there was an interaction between both* [$F_{(21, 265)} = 6.55; p < 0.0001$]). In the same sense, ELS or restraint in adulthood caused a lower extinction gain ratio (*experimental group* [$F_{(3, 51)} = 3.05; p < 0.05$], *time* [$F_{(6, 102)} = 40.43; p < 0.0001$], and *there was an interaction between both* [$F_{(18, 228)} = 10.02; p < 0.0001$]).

Conclusion

Thus, adult females present high responsiveness to stress. ELS was a risk factor in female offspring, causing late counterproductive consequences on aversive memory extinction and oxidative stress in stress-modulatory structures.

Financial Support: USP, CAPES, CNPq, FAPESP

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA DIAPORTEÍNA B EM ASSOCIAÇÃO COM O SN38 OU 5-FU USADOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE CÓLON RETAL

Domingos, H.V.¹; L. V.¹; Peña-Hidalgo, M.²; Ferreira, M.J.P.²; Costa-Lotufo, L.V.¹

¹Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, Brasil.

²Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (IB-USP), Brasil.

Introdução: Uma grande parte dos medicamentos antineoplásicos utilizados na prática clínica são derivados de produtos naturais, incentivando a busca contínua por novos compostos naturais que possam impactar a terapia oncológica. A diaporteína B (DTB) é um diterpeno derivado de um fungo endofítico cultivado a partir de *Bignonia magnifica* W. Bull, uma liana ornamental nativa da Colômbia com atividade antifúngica e antitumoral relevante, especialmente em células de câncer de cólon. Aqui, o potencial citotóxico DTB foi avaliado quando combinado com dois compostos usados no tratamento do câncer de cólon 5-fluorouracil (5-FU) e SN-38, um metabólito ativo do irinotecano.

Metodologia: A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT. Primeiramente, DTB, SN38 e 5-FU foram testados separadamente em concentrações crescentes (0,002-27 μM ; 0,0004-5 μM e 0,003-50 μM , respectivamente) para obter a IC_{50} em células de carcinoma de cólon (HCT-116) e células de cólon não tumorais (CCD18Co) após 72h de incubação. A doxorubicina foi usada como controle positivo. Em seguida, DTB e 5-FU ou DTB e SN38 foram avaliados em combinação em células HCT-116. Os resultados foram analisados usando os softwares GraphPad Prism (versão 9) e CompuSyn (versão 1.0.1).

Resultados: O tratamento com DTB, 5-FU e SN38 apresentou atividade citotóxica em células HCT-116, com valores de IC_{50} de 1,01 μM , 0,95 μM e 0,06 μM , respectivamente, enquanto o tratamento com DTB, 5-FU e SN38 apresentou baixa atividade de citotoxicidade contra células CCD18Co, com valores de IC_{50} superiores a 25 μM para DTB e 5-FU, e 11,78 μM para SN38. Os resultados com o tratamento combinado de DTB com 5-FU ou SN38 durante um período de exposição de 72h não mostraram nenhum sinergismo entre eles em comparação com o tratamento individual. Quando a duração do tratamento foi reduzida para 24h, a combinação mostrou sinergismo significativo entre a combinação do SN38 (0,0125 e 0,02 5 μM) com a DTB (0,125 μM) quando comparados com o tratamento individual.

Conclusão: A DTB apresentou uma atividade citotóxica forte e seletiva para células de câncer de cólon, e sua combinação com fármacos clinicamente utilizados mostrou resultados diferentes dependendo do tempo de incubação. Outros experimentos são necessários para entender melhor os mecanismos envolvidos na atividade da DTB isoladamente ou em combinação com outros fármacos.

Apoio Financeiro: CAPES (código de financiamento 001), CNPq/MCTI/CT-BIOTEC- Projeto:440472/2022-9 e FAPESP: 2014/50926-0

A ESTIMULAÇÃO NEURONAL COLINÉRGICA NO LDTg MELHORA OS DISTÚRBIOS RESPIRATÓRIOS E DE SONO OBSERVADOS EM UM MODELO MURINO DA DOENÇA DE PARKINSON. Miranda^{1,2}, N. C.; Oliveira², L. M.; Moreira^{2,3}, T. S.; Kalume^{2,4}, F.; Ramirez^{2,4}, J.M.; Takakura^{1,2}, A. C.^{1,2} Departamento de Farmacologia¹ e de Fisiologia e Biofísica³, Instituto de Ciências Biomédicas-USP; ²Center for Integrative Brain Research, Seattle Children's Research Institute; ⁴Department of Neurological Surgery, University of Washington.

Introdução e Objetivos: A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta (SNpc), os sintomas incluem alterações respiratórias e do sono. O núcleo tegmental laterodorsal (LDTg) é uma região crucial para a regulação do sono e potencialmente para o controle respiratório. Assim, nosso objetivo foi ativar os neurônios colinérgicos no LDTg afim de melhorar os distúrbios do sono e respiratórios em um modelo murino de DP.

Métodos e Resultados: Camundongos adultos (CEUA: 6641200919 e 8760150318; SCRI: 18819) que expressam a proteína cre em células colinérgicas (ChAT^{cre} Ai6) receberam injeções bilaterais de vetores AAV-hM3D(Gq)-mCherry ou AAV-mCherry no LDTg. Após 10 dias, foram submetidos a injeções nigroestriatais de veículo ou 6-hidroxidopamina (6-OHDA, 10 µg/µl) para induzir o modelo de DP. Após 8 dias, houve o implante de eletrodos de eletroencefalograma (EEG) e eletromiograma (EMG) para registro do sono.

Nos camundongos injetados com 6-OHDA, houve uma redução de 80% e 24% no número de neurônios dopaminérgicos na SNpc e colinérgicos no LDTg, respectivamente. Essa degeneração se relacionou com a diminuição na frequência respiratória (fR) durante o sono de movimento ocular não rápido (NREM) em 17% e no sono de movimento ocular rápido (REM) em 26%. Além disso, houve um aumento de cinco e seis vezes nas apneias durante os sonos NREM e REM, respectivamente. Esses camundongos também apresentaram redução de 15% no tempo de vigília e aumento de 10% no tempo total de sono NREM.

A estimulação farmacogenética seletiva, com clozapina (CNO) intraperitoneal (ip), de neurônios ChAT⁺ no LDTg resgatou a frequência respiratória e reduziu apneias durante os sonos NREM e REM e aumentou o suspiro durante a vigília em camundongos 6-OHDA. Durante a mesma estimulação, em animais controle, observamos um aumento de mais de duas vezes no tempo de vigília e da fR em comparação com o mesmo grupo com salina ip, resultando em uma diminuição concomitante no tempo total de sono e não tiveram episódios de sono REM.

Conclusão: Este estudo mostrou uma degeneração no LDTg no modelo murino de DP induzido por 6-OHDA, impactando a fR normal e os padrões de sono. A estimulação seletiva dos neurônios colinérgicos no LDTg resulta na normalização dos parâmetros respiratórios e do padrão de sono, além de alterar toda a arquitetura do sono em animais de controle, indicando um papel fundamental na modulação da respiração e do sono.

Apoio Financeiro: FAPESP, CAPES-PROEX, CNPq e NIH.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CONGRESSO ICB 55 ANOS

03, 04 e 05 DE SETEMBRO DE 2024

ALDOSTERONA ADMINISTRADA POR VIA INALATÓRIA DIMINUI O NÚMERO DE CÉLULAS
TOTAIS DO LAVADO BRONCOALVEOLAR EM MODELO DE SDRA INDUZIDA POR LPS

Lima-Julia J.L.¹; Tavares-de-Lima, W.¹; Rodrigues S.F.¹; Oliveira T.D.¹; Santos A.A.¹; Oliveira M.
A.¹; Santos E.G.¹;

¹*Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.*

stephen.rodrigues@usp.br

Palavras-Chave: *Inflamação pulmonar; Aldosterona; Edema; LPS; Camundongo;*

Abstract

Introdução. A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) é uma lesão pulmonar aguda que causa aumento da permeabilidade vascular, perda da integridade alvéolo-capilar, depleção de surfactante e redução do tecido pulmonar aerado. Isso leva a hipoxemia refratária, menor complacência pulmonar e aumento do espaço morto. A SDRA, muitas vezes, é refratária às terapias convencionais como a ventilação de baixo volume corrente e corticosteroides, sendo uma das principais causas de mortalidade nas UTIs, com incidência crescente. A aldosterona, um hormônio mineralocorticoide que controla o líquido corporal e é secretado pelo córtex adrenal, atua nos canais ENaC do ducto coletor distal renal, aumentando a reabsorção de sódio e consequentemente de fluidos. Existem receptores de aldosterona nas células epiteliais pulmonares, sugerindo que sua administração inalatória poderia mitigar o edema decorrente da SDRA em modelo murino.

Objetivos: Determinar o efeito do tratamento por via inalatória com aldosterona em modelo experimental de SDRA induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e seu mecanismo de ação.

Métodos. A SDRA foi induzida em camundongos machos C57Bl/6, livres de patógenos específicos, com 8 a 12 semanas de idade (CEUA nº 5789110723). Os animais foram anestesiados com isoflurano e receberam injeção intratraqueal (I.T.) de LPS a 5 mg/kg ou água destilada (controle). Duas horas após a indução, os animais foram levemente sedados e tratados por via inalatória com aldosterona (100 µg/mL em etanol a 1%) ou veículo da aldosterona, administrado por nebulizador apenas pelo nariz por cerca de 30 minutos. Após 24 horas, foram avaliados a permeabilidade alvéolo-capilar (proteínas no BAL, kit BCA), relação entre massas úmida e seca do pulmão, leucograma, contagem celular total e diferencial no BAL.

Resultados: Observamos maior número de células totais no BAL no grupo LPS do que no controle, indicando um maior recrutamento de células. Como esperado, houve uma

diminuição no número de células totais do BAL no grupo LPS tratado com aldosterona. Na contagem diferencial total das células do BAL, confirmamos que o grupo LPS e tratado teve um maior número de neutrófilos recrutados quando comparado ao grupo sham. O grupo LPS apresentou um maior número de proteínas no BAL, um indicativo de edema, e o tratamento não colaborou com a diminuição desse número. Não houve diferença entre os grupos no hemograma, e massas úmidas e secas do pulmão.

Conclusão: A aldosterona administrada por via inalatória foi capaz de diminuir o número de células totais recrutadas no BAL, no entanto não foi capaz de reduzir o edema em camundongos com SDRA induzida por LPS.

Apoio Financeiro

Bolsa: CNPq PIBIC - 2023 Código do Projeto: 2023-1546; FAPESP: #2023/05115-2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CONGRESSO ICB 55 ANOS
03, 04 e 05 DE SETEMBRO DE 2024

ALDOSTERONA ADMINISTRADA POR VIA INALATÓRIA DIMINUI O NÚMERO DE CÉLULAS DO LAVADO BRONCOALVEOLAR EM MODELO DE SDRA INDUZIDA POR LPS

Lima-Julia J.L.¹; Oliveira T.D¹; Santos A.A¹; Santos E.G¹; Oliveira M.A¹; Tavares-de-Lima, W.¹; Rodrigues S.F.¹

¹*Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.*

Contact: stephen.rodrigues@usp.br

Palavras-Chave: *Inflamação pulmonar; Aldosterona; Edema; LPS; Camundongo;*

Abstract

Introdução. A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) é uma lesão pulmonar aguda que causa aumento da permeabilidade vascular, perda da integridade alvéolo-capilar, depleção de surfactante e redução do tecido pulmonar aerado. Isso leva à hipoxemia refratária, menor complacência pulmonar e aumento do espaço morto. A SDRA, muitas vezes, é refratária às terapias convencionais como a ventilação de baixo volume corrente e corticosteroides, sendo uma das principais causas de mortalidade nas UTIs, com incidência crescente. A aldosterona, um hormônio mineralocorticoide que controla o líquido corporal e é secretado pelo córtex adrenal, atua nos canais ENaC do ducto coletor distal renal, aumentando a reabsorção de sódio e consequentemente de fluidos. Existem receptores de aldosterona nas células epiteliais pulmonares, sugerindo que sua administração inalatória poderia mitigar o edema decorrente da SDRA em modelo murino.

Objetivos: Determinar o efeito do tratamento por via inalatória com aldosterona em modelo experimental de SDRA induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e seu mecanismo de ação.

Métodos. A SDRA foi induzida em camundongos machos C57Bl/6, livres de patógenos específicos, com 8 a 12 semanas de idade (CEUA nº 5789110723). Os animais foram anestesiados com isoflurano e receberam injeção intratraqueal (I.T.) de LPS a 5 mg/kg ou água destilada (controle). Duas horas após a indução, os animais foram levemente sedados e tratados por via inalatória com aldosterona (100 µg/mL em etanol a 1%) ou veículo da aldosterona, administrado por nebulizador apenas pelo nariz por cerca de 30 minutos. Após 24 horas, foram avaliados a permeabilidade alvéolo-capilar (proteínas no BAL, kit BCA), relação entre massas úmida e seca do pulmão, leucograma, contagem celular total e diferencial no BAL.

Resultados: Observamos maior número de células totais no BAL no grupo LPS do que no controle, ($142,6 \pm 11,32$ vs. $9,7 \pm 0,8 \times 10^5$ células/mL, N= 10), indicando um maior recrutamento de células. Houve uma diminuição no número de células totais do BAL no grupo LPS tratado com aldosterona ($41,5 \pm 4,8 \times 10^5$ células/mL, N= 12). Na contagem diferencial total das células do BAL, confirmamos que o grupo LPS teve um maior número de neutrófilos recrutados comparado ao grupo sham e o tratamento reduziu esse número. Além disso, o grupo LPS apresentou um maior número de proteínas no BAL ($1,07 \pm 0,18$ vs. $0,52 \pm 0,11$ mg/mL, N=10), um indicativo de edema, entretanto o tratamento não reduziu esse número ($1,22 \pm 0,28$ mg/mL, N=10). Não houve diferença entre os grupos no hemograma, nem na relação entre as massas úmida e seca do pulmão.

Conclusão: A aldosterona administrada por via inalatória foi capaz de diminuir a invasão neutrofílica no BAL, mas não reduziu o edema em camundongos com SDRA induzida por LPS.

Apoio Financeiro

Bolsa: CNPq PIBIC - 2023 Código do Projeto: 2023-1546; FAPESP: #2023/05115-2; CAPES financiamento cód. 001.

Título

PADRONIZAÇÃO DE ESFEROIDES DE MCF-7 E INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE COLÁGENO SOBRE ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Autores

Coelho, L.M.¹, Kawassaki, R.K.^{1,2}, Malagó, I.D.¹, Garnique, A.D.M.B.¹, Melo, G.B.¹, Lopes, L.B.¹

¹Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

²Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Introdução e objetivos

O câncer de mama é a neoplasia maligna que mais acomete mulheres no mundo. A cultura celular em 3D surgiu como meio de mimetizar o microambiente tumoral. O colágeno está presente na matriz extracelular e sua adição pode auxiliar a formação de esferoides de diversos tipos celulares. Este projeto tem como objetivo a avaliação de como esta proteína influencia estudos de viabilidade celular, integridade e conformidade dos esferoides.

Método e Resultados

Foram produzidos esferoides com células de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 por meio do método de sobreposição líquida (utilizando agarose a 1%) em diferentes densidades celulares iniciais (5x , 1x , 2x e 4x células/esferoide). Foi estabelecida a utilização da densidade de 5x células/esferoide; o crescimento dos esferoides com e sem adição de colágeno (3,75 µg/mL e 7,5 µg/mL) foi avaliado por 14 dias com auxílio do software ImageJ. A técnica de quantificação de hidroxiprolina foi aplicada para quantificação do colágeno nos esferoides 5 dias após as células serem semeadas. A viabilidade dos esferoides com e sem adição de colágeno foi avaliada utilizando o kit comercial CellTiter Glo® (Promega) por quantificação de ATP, com o objetivo de avaliar a influência da adição de colágeno sobre o ensaio. Os esferoides formados a partir das densidades 5x e 1x demonstraram formato esférico quando medidos os diâmetros e centro necrótico presente. Os esferoides com colágeno adicionado (3,75 µg/mL) apresentaram maior conformidade esférica, assim, essa foi a concentração selecionada como padrão. O colágeno produzido e adicionado (18,75 µg/mL) na cultura se localizou predominantemente no meio extracelular, porém os esferoides com colágeno adicionado apresentaram quantidade pronunciadamente elevada da proteína em comparação aos controles (aumento de 1,62 vezes). Os resultados do ensaio de quantificação de ATP não foram significativamente diferentes entre os dois grupos experimentais, indicando que a adição de colágeno não interfere na avaliação da viabilidade celular por esse método.

Conclusão

Os esferoides, em densidades menores, apresentaram caráter mais próximo a esferas e houve a formação do centro necrótico. Em relação ao colágeno, a concentração influenciou na conformação e integridade das esferas, porém não conferiu maior viabilidade celular.

Apoio Financeiro

O apoio financeiro foi proporcionado pela CAPES (001), CNPq, INCT Nanofarma e FAPESP (2018/13877-1).

EFEITOS DA DELEÇÃO DE TNFR1 NA MEMÓRIA, EMOÇÃO E MOTIVAÇÃO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE DIABETES TIPO 1. LIMA, T.A.S., LIMA, L.S., ANDREOTTI, D.Z., SCAVONE, C., KAWAMOTO, E.M., Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introdução e Objetivos: O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) está associado ao desenvolvimento de dano cognitivo. O modelo de DM1 pela administração de estreptozotocina (STZ) é capaz de replicar o desenvolvimento de dano cognitivo, associado com neuroinflamação e estresse oxidativo. O receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1) possui sinalização pró-inflamatória e sua participação nos efeitos do DM1 ainda não é conhecida. Portanto, decidimos verificar os efeitos do modelo de DM1 na memória, comportamento tipo-ansioso e motivação de animais selvagens e com deleção de TNFR1.

Métodos e Resultados: Foram utilizados 53 camundongos machos selvagens (WT) e TNFR1 nocaute (TNFR1 KO) (3-4 meses), divididos em quatro grupos: (A) WT + VEH (n=13); (B) WT + STZ (n=13); (C) TNFR1 KO + VEH (n=13); (D) TNFR1 KO + STZ (n=14). Foi administrado STZ ou veículo (VEH). Animais cuja glicemia em jejum foi > 250 mg/dl foram incluídos no estudo. Duas semanas pós-STZ, foram realizados os testes comportamentais: alternância espontânea, campo aberto e procura por novidade. Foi utilizada ANOVA de duas vias, com pós-teste de Tukey para interação e Bonferroni para efeitos simples. As diferenças foram consideradas significativas para o valor $p < 0,05$. Procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número de registro 7772051121.

No teste de alternância espontânea, a latência ao longo das sessões apresentou efeito significativo [tempo: $F(6, 292) = 3,894$, $p < 0,001$; grupo: $F(3, 49) = 11,14$, $p < 0,0001$]. A latência somada demonstrou aumento [hiperglicemia: $F(1, 49) = 29,96$, $p < 0,0001$] dos grupos diabéticos WT ($p < 0,01$) e TNFR1 KO ($p < 0,0001$). A alternância espontânea [genótipo: $F(1, 49) = 10,60$, $p < 0,01$] do grupo normoglicêmico TNFR1 KO foi reduzida em comparação ao WT ($p < 0,05$). A habituação ao campo aberto [tempo: $F(5, 245) = 96,20$, $p < 0,0001$], foi realizada por todos os grupos ($p < 0,0001$). A distância percorrida nos 5 minutos iniciais [hiperglicemia: $F(1, 49) = 39,98$, $p < 0,0001$] foi reduzida nos grupos diabéticos WT ($p < 0,0001$) e TNFR1 KO ($p < 0,01$). O tempo no centro e número de levantamentos (*rearing*) não foram alterados. No teste de procura por novidade, houve redução da distância percorrida [hiperglicemia: $F(1, 49) = 31,29$, $p < 0,0001$] dos grupos diabéticos ($p < 0,001$). A exploração do objeto não foi alterada, enquanto o tempo na área de exploração [genótipo: $F(1, 49) = 4,905$, $p < 0,05$], não demonstrou diferenças no pós-teste.

Conclusão: Não foi observado dano cognitivo duas semanas pós-STZ, porém a deleção de TNFR1 prejudicou a memória de trabalho. O DM1 provoca redução da locomoção, porém sem alterações no comportamento motivado de aproximação.

Apoio Financeiro: CAPES e FAPESP

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE MUTAÇÕES NO GENE *TP53* NO DESFECHO CLÍNICO E NA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA P53 COM O FÁRMACO APR-246 EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Bertoline LMF, Lima K, Machado-Neto JA

Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica agressiva originada de mutações em células-tronco hematopoiéticas, transformando-as em células neoplásicas. O tratamento da LMA envolve três etapas: terapia de indução, consolidação e manutenção. No entanto, muitos pacientes sofrem recidiva ou falecem após a primeira remissão. Estudos genômicos permitiram identificar genes associados ao fenótipo hemato-neoplásico, possibilitando o desenvolvimento de terapias direcionadas. O gene TP53 codifica a proteína supressora de tumor p53, crucial na biologia do câncer. Mutações em TP53 ocorrem em 10 a 20% dos casos de LMA, associadas a um prognóstico desfavorável e alta refratariedade aos agentes quimioterápicos. O composto APR-246, que reativa a p53 mutada, mostra potencial em restabelecer suas funções supressoras de tumor. No entanto, diferentes mutações no gene TP53 podem influenciar a resposta ao tratamento, destacando a necessidade de estudos específicos. Este trabalho visa investigar o impacto de mutações no TP53 em pacientes com LMA, incluindo características clínico-laboratoriais, resposta terapêutica e desfecho clínico, além de analisar as alterações na estrutura proteica e na interação com o APR-246 moduladas pela mutação. Para tal, inicialmente, foram avaliadas duas coortes quanto às mutações associadas ao fenótipo de LMA. A primeira coorte é proveniente da Oregon Health & Science University, em Portland, Oregon, EUA (Beat AML), composta por 942 amostras de LMA obtidas de 805 pacientes; apenas amostras coletadas no momento do diagnóstico serão incluídas. A segunda coorte provém do consórcio The Cancer Genome Atlas (TCGA) e é composta por 200 amostras de 200 pacientes. Delas, estamos analisando as mutações identificadas nas 64 amostras que apresentam alteração no gene TP53. No total, identificamos 60

mutações distintas, sendo: 35 missense, 10 frame shift, 6 stop codon e 8 splice. Atualmente, análises computacionais estão sendo realizadas para determinar as mutações que serão utilizadas nos ensaios de docking e simulação de dinâmica molecular para avaliar a interação do composto com a proteína. Dentre as mutações, destaca-se a R248Q, que aparece com maior frequência em nosso grupo amostral. Essa mutação, que está localizada em um hotspot, é classificada funcionalmente como dominante negativa, e segundo preditores, como patogênica e provavelmente danosa. Em seguida, avaliaremos os efeitos do APR-246 sobre mutações específicas em TP53, em relação à proliferação, apoptose, autofagia e progressão do ciclo celular na vigência de agentes quimioterápicos de uso clínico em modelos experimentais de LMA. Apoio: FAPESP, CAPES e CNPq.

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE MUTAÇÕES NO GENE *TP53* NO DESFECHO CLÍNICO E NA INTERAÇÃO DA PROTEÍNA P53 COM O FÁRMACO APR-246 EM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

Bertoline LMF, Lima K, Machado-Neto JA

Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

Introdução e Objetivo

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica agressiva originada de mutações em células-tronco hematopoiéticas, transformando-as em células neoplásicas. O tratamento da LMA envolve três etapas: terapia de indução, consolidação e manutenção. No entanto, muitos pacientes sofrem recidiva ou falecem após a primeira remissão. Estudos genômicos permitiram identificar genes associados ao fenótipo hemato-neoplásico, possibilitando o desenvolvimento de terapias direcionadas. O gene TP53 codifica a proteína supressora de tumor p53, crucial na biologia do câncer. Mutações em TP53 ocorrem em 10 a 20% dos casos de LMA, associadas a um prognóstico desfavorável e alta refratariedade aos agentes quimioterápicos. O composto APR-246, que reativa a p53 mutada, mostra potencial em restabelecer suas funções supressoras de tumor. No entanto, diferentes mutações no gene TP53 podem influenciar a resposta ao tratamento, destacando a necessidade de estudos específicos. Este trabalho visa investigar o impacto de mutações no TP53 em pacientes com LMA, além de analisar as alterações na estrutura proteica e na interação com o APR-246 moduladas pela mutação.

Métodos e Resultados

Inicialmente, foram avaliadas duas coortes quanto às mutações associadas ao fenótipo de LMA. A primeira coorte é proveniente da Oregon Health & Science University, em Portland, Oregon, EUA (Beat AML), composta por 942 amostras de LMA obtidas de 805 pacientes; apenas amostras coletadas no momento do diagnóstico serão incluídas. A segunda coorte provém do consórcio The Cancer Genome Atlas (TCGA) e é composta por 200 amostras de 200 pacientes. Delas, estamos analisando as mutações identificadas nas 64 amostras que apresentam alteração no gene TP53. No total, identificamos 60 mutações distintas, sendo: 35 missense, 10 frame shift, 6 stop codon

e 8 splice. Atualmente, análises computacionais estão sendo realizadas para determinar as mutações que serão utilizadas nos ensaios de docking e simulação de dinâmica molecular para avaliar a interação do composto com a proteína. Dentre as mutações, destaca-se a R248Q, que aparece com maior frequência em nosso grupo amostral. Essa mutação, que está localizada em um hotspot, é classificada funcionalmente como dominante negativa, e segundo preditores, como patogênica e provavelmente danosa.

Conclusão

Até o prezado momento, identificamos 60 mutações distintas em TP53, sendo que uma delas já destaca-se mediante sua frequência e efeito. Deste modo, ela se torna uma das mutações específicas em TP53 em que avaliaremos os efeitos do APR-246 em relação à alguns fatores na vigência de agentes quimioterápicos de uso clínico em experimentos de LMA.

Apoio: FAPESP, CAPES e CNPq.

Estudo de Nanoemulsões para administração tópica-transdérmica da fenretinida na pele das mamas para utilização na terapia preventiva do câncer de mama

Nunes, J.R., Lopes, L.B. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: Considerando a alta incidência do câncer de mama e a dificuldade de implementação das estratégias disponíveis para inibir ou reverter o desenvolvimento da doença e sua recorrência devido às ínfimas opções existentes com esse propósito e seus efeitos colaterais, fica clara a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de quimioprevenção. Sendo necessário que quantidades suficientes de fármaco se localizem apenas no tecido mamário para a quimioprevenção, propomos a veiculação tópica da fenretinida na pele das mamas, visando a terapia tópica-transdérmica para aliar eficácia, segurança e comodidade dos pacientes. Para viabilizar a administração cutânea, a fenretinida foi incorporada em nanoemulsões (NE) contendo limoneno para promoção da penetração na pele e potencialização da citotoxicidade. **Métodos:** NE foram produzidas usando sonicação em haste em banho de gelo e a caracterização foi realizada utilizando espalhamento de luz dinâmica (ZetaSizer NanoZS). A incorporação de limoneno (1-5% m/m) e foi estudada. O potencial de irritação foi estudado utilizando o HET-CAM para avaliação da hemorragia, lise e coagulação (protocolo 70/2016). O ensaio de penetração cutânea foi conduzido em células de difusão de Franz e a quantificação de fenretinida foi realizada utilizando UV-HPLC em fase reversa. O efeito citotóxico das NE foi avaliado utilizando células tumorais mamárias MCF-7 e MDA-MB-231 em monocamada, e a viabilidade celular foi investigada usando MTT após tratamento por 24 e 48h. O efeito das NE na migração de células tumorais de mama foi avaliado utilizando insertos transwell após tratamento por 24h. **Resultados:** A mudança na concentração de limoneno influenciou o diâmetro do sistema, sendo que 1% limoneno promoveu redução em 1.9 vezes do diâmetro em comparação com a NE composta com 5% de limoneno. Contudo, a maior concentração de terpeno resultou em sistemas não estáveis no período de 180 dias. A penetração cutânea da fenretinida foi influenciada pelo tempo e a concentração de limoneno. No período de 12h, a NE com 2.5% de limoneno aumentou a penetração da fenretinida em 3.5 vezes comparado a NE com 1% de limoneno. Este sistema também reduziu o IC₅₀ do fármaco em ambas as linhagens celulares e tempos de tratamento, promovendo uma redução de 2.5 e 2.4 vezes para células MCF-7, e 1.5 e 3.4 vezes para MDA-MB-231, em comparação a NE s/ limo, para 48h e 72h respectivamente. Independente da concentração de terpeno, as NE promoveram uma redução de 2 vezes na migração celular em comparação ao controle, em ambas as linhagens estudadas. **Conclusão:** a incorporação do limoneno na NE a 2,5% foi capaz de aumentar a penetração da fenretinida e diminuir o IC₅₀ em todas as linhagens celulares estudadas. Com isso, demonstramos as vantagens da co-incorporação de limoneno e fenretinida em NE. **Apoio financeiro:** Este trabalho recebe apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – “Código de Financiamento 001” e da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) projetos 2021/06755-0 e 2018/13877-1.

DESVENDANDO O PAPEL DAS PROTEÍNAS INIBIDORES DA APOPTOSE (IAP) NO MELANOMA: PERCEPÇÕES DA BIOINFORMÁTICA E ABORDAGENS EXPERIMENTAIS

Catarina S. M. Reis e Silva^a, João A. Machado-Neto^a e Letícia V. Costa-Lotufo^a

^aInstituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 05508-900, Brasil

e-mail: catarinasofia@usp.br

Introdução: A apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada regulada por proteínas, essencial para o desenvolvimento embrionário normal, integridade do genoma, função do sistema imunológico e homeostase tecidual. A desregulação dela permite que as células tumorais sobrevivam e proliferem. Consequentemente, pesquisas direcionadas aos membros da família das IAPs são abundantes e, apesar do progresso, questões sobre a biologia das IAPs no câncer permanecem sem resposta, oferecendo oportunidades para futuras descobertas de tratamentos. **Métodos:** Analisamos os dados de 33 tipos de câncer por meio da plataforma TIMER 2.0 para identificar IAPs altamente expressas em tumores. Com foco nos dados de coorte de melanoma cutâneo do TCGA depositados no cBioPortal, analisamos a expressão de IAPs em estadiamentos e resultados de sobrevivência usando GraphPad Prism 8.0. Os dados de RNA-seq foram pré-classificados por expressão diferencial com limma-voom no Galaxy. Os dados foram analisados no GSEA v.4.0, usando conjuntos de genes Hallmark do MSigDB, com uma taxa de descoberta falsa (FDR) de 25% e um valor $p < 0,05$. A viabilidade celular foi medida com um ensaio MTT [5×10^3 células (SK – MEL – 19, SK – MEL – 28, SK – MEL – 147, SK – MEL – 173, 501 – MEL e HT – 144)] por poço que foram semeadas em uma placa de 96 poços e expostas a concentrações crescentes de doxorrubicina ou cefalocromina ou YM155 ou PLX por 72 h. Os valores de IC50 foram calculados utilizando análise de regressão não linear no GraphPad Prism 8. **Resultados:** A partir de nossa análise no TIMER 2.0, escolhemos o melanoma como câncer de interesse devido à superexpressão de 5 de 8 IAPs em pacientes com melanoma. A alta expressão de BIRC5 foi identificada como um fator preditor de mau prognóstico, o que se alinha com pesquisas existentes e mostrou enriquecimento nas vias metabólicas de MYC, pirimidina e purina. Por outro lado, NAIP, BIRC3 e XIAP foram considerados fatores de proteção. BIRC3 foi encontrado enriquecido em vias relacionadas a respostas inflamatórias, linhagem de células hematopoiéticas e sinalização KRAS e JAK-STAT. Também foi encontrado regulado positivamente em processos que envolvem respostas imunes humorais, incluindo proliferação de células B, ativação, diferenciação e proliferação de linfócitos. Para validar esses achados bioinformáticos, realizamos ensaios *in vitro* em linhagens celulares de melanoma. YM155 e cefalocromina produziram os melhores resultados na redução da viabilidade. **Conclusão:** O projeto está na fase inicial e requer mais estudos para sua conclusão.

Apoio financeiro: Fapesp (2023/08735-1); CAPES (88887.893747/2023-00); CNPq.

COMPARATIVE STUDY AMONG PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF NLCS CONTAINING VEGETABLE BUTTERS AND THEIR RESPECTIVE EMULSIONS

Costa, A.B.C., Daré, R.G., Lopes, L.B., Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences-USP

Introduction and objectives.

The financial burden of patients with persistent skin wounds on the public health system gets worse due to increased longevity. Researchers indicate that the application of vegetable butters in conjunction with antioxidants like quercetin may hasten the healing process of wounds. Employing cutting-edge platforms such as nanostructures lipid nanocarriers (NLCs) might potentialize the features regarding vegetable butters and quercetin. In order to evaluate the chemical-physical properties of these NLCs in comparison to their corresponding emulsions, the current work developed NLCs by mixing liquid lipids with vegetable butters. Furthermore, quercetin was added to NLCs, and their properties were assessed as well.

Methods and results.

The hot emulsification-sonication approach was used to create NLCs. Two types of nanocarriers were created: one with shea butter and another with cocoa butter. The emulsions were not sonicated, although they included the same ingredients. Size distribution, zeta potential, shape, and association efficiency (AE) of the formulations were all characterized. Quercetin was added to NLCs at concentrations between 0.5 and 2.5 percent, and UV-VIS was used to assess the AE. Zeta potentials were approximately -20 mV, and particle sizes varied from 200 to 240 nm. Using scanning electron microscopy, spherical shape was demonstrated. While loaded NLCs retained their features for seven days, unloaded NLCs were stable for about thirty days. AE for quercetin remained constant at roughly 50% across both butters, regardless of concentration.

Conclusions.

The results show nanostructuring vegetables butters is viable and the chemical-physical characteristics are satisfactory. Incorporating quercetin does not change significantly overall features. In addition, the association efficiency of quercetin integrated to NLCs does not depend on concentration. Thus, it is possible to assess future studies comprising the biological effects of developed NLCs.

Financial support.

I would like to acknowledge Programa Unificado de Bolsas (PUB) for its financial support.

OS EFEITOS DO AGONISTA CANABINÓIDE WIN 55212-2 NO MODELO CELULAR DE DELEÇÃO DA KLOTHO

POSSEBOM I. R., SANTOS G. R. O., KAWAMOTO E. M. I

Departamento de farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP)

Introdução: A neurogênese, um processo em que neurônios e células da glia são formadas a partir de células progenitoras neurais (NPCs), pode retardar o envelhecimento e prevenir doenças neurodegenerativas. Estudos recentes descreveram que a deficiência da proteína Klotho pode prejudicar o processo de neurogênese no hipocampo. Além disso, o agonista canabinóide WIN55212-2 demonstrou ser capaz de promover a neurogênese em NPCs.

Objetivo: objetivo do projeto foi avaliar a influência da hipofunção da proteína Klotho na neurogênese de NPCs de embriões heterozigotos; bem como a possível ação neuroprotetora do agonista canabinóide WIN55212-2 em promover a neurogênese neste contexto.

Métodos: Embriões heterozigotos (Kl+/-) e selvagens (Kl+/+) (d=14,5-16,5) foram extraídos de uma camundonga klotho prenha, e foram dissecados para coletar o telencéfalo. O tecido passou pelo protocolo de cultura da neuroesfera e foi plaqueado: 1) Ensaios de MTT e LDH para padronização do tratamento WIN55212-2; 2) Ensaios de proliferação com ou sem o tratamento com o WIN 3) Ensaio de diferenciação com ou sem o tratamento com o WIN. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student não pareado ou ANOVA 1 e 2 fatores. As diferenças foram consideradas significativas para valor de $P < 0,05$. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA 4028260422).

Resultados: Nos ensaios de LDH e MTT não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados com WIN por 48 h (0,5, 2,5 5, 10 e 20 μ M) e o grupo controle nas neuroesferas kl+/- e kl+/+ (n=6). Na análise de proliferação, não houve diferença estatística no número e diâmetro médio das neuroesferas entre os genótipos kl+/- e kl+/+ (n=5). No ensaio de diferenciação, não houve diferença estatística no número de neurônios, astrócitos e células totais entre as neuroesferas kl+/- e kl+/+. Porém, também na diferenciação, as neuroesferas kl+/- mostraram uma diminuição na intensidade de fluorescência total do CB2 em comparação com neuroesferas kl+/+ (n=6). No ensaio de proliferação e diferenciação após 6 dias de tratamento com 2,5 e 5 μ M WIN, não houve diferença estatística nos parâmetros quantificados em cada teste

nas células de ambos os genótipos em comparação ao grupo controle (n=3).

Conclusão: O tratamento com WIN 55212-2 não alterou significativamente os parâmetros quantificados nos ensaios de proliferação e diferenciação. Entretanto, a deficiência de klotho foi capaz de reduzir a fluorescência de CB2 na diferenciação. **Apoio Financeiro:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, CAPES e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

CHITOSAN-PECTIN HYDROGEL LOADED WITH SIMVASTATIN AND ADENOSINE-ENCAPSULATED NANOCARRIERS FOR WOUND HEALING

¹DARÉ, R.G.; ¹LOPES, L.B.

¹Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

Introduction: Chronic wounds represent a significant global health burden. This study aimed to develop a novel nanocarrier system for the co-delivery of simvastatin and adenosine to enhance wound healing. Nanostructured lipid carriers (NLCs) were developed and incorporated into an optimized chitosan-pectin hydrogel for topical administration purposes. **Methods:** The NLCs were prepared using a hot homogenization-sonication method with a double emulsion technique. Formulation optimization involved screening various surfactants, solid, and liquid lipids, yielding ten formulations. Characterization encompassed particle size, zeta potential, morphology, and encapsulation efficiency, with F5 being selected for further experiments. HaCaT keratinocytes were employed to assess wound cell repopulation and collagen production, and the egg—chorioallantoic membrane (CAM) assay was used to evaluate angiogenesis stimulation. The hydrogel containing NLCs was assessed for wound repopulation in HaCaT cells, irritation potential in the egg CAM assay, and skin retention in wounded porcine ear skin. **Results:** Formulation F5 exhibited a mean particle size ranging from 175 to 225 nm, with a zeta potential of approximately -20 mV. Transmission electron microscopy revealed a spherical morphology of the nanoparticles. Encapsulation efficiency was around 100% for simvastatin, while adenosine displayed less than 20%. *In vitro* studies demonstrated that F5 significantly promoted cell proliferation/migration (up to 86% wound closure), stimulated extracellular collagen secretion (up to 23%), and promoted angiogenesis. Studies analyzing the F5-loaded hydrogel revealed promotion of wound closure in HaCat cells, without inducing any irritation signs in egg CAM. Moreover, both simvastatin and adenosine exhibited significantly higher skin retention compared to skin permeation in wounded porcine ear skin. **Conclusion:** These findings collectively suggest that F5-loaded hydrogel holds potential as a promising carrier system for the co-delivery of simvastatin and adenosine in topical wound healing applications.

Keywords: Angiogenesis; Cell proliferation; Wound repair; Lipid nanocarrier.

Acknowledgements: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Tecnológico (CAPES) (001) and FAPESP (2018/13877-1, 2022/12876-7).

STRESS-INDUCED BEHAVIORAL AND NEUROBIOLOGICAL CHANGES ARE DEPENDENT ON LATE PHASE PROTEIN SYNTHESIS IN THE BASOLATERAL AMYGDALA

Juliano, V.A.L.¹, Novaes, L.S.², Munhoz, C.D.¹ - Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences – USP/ São Paulo, Brazil¹; Max Planck Institute for Biological Cybernetics, Max Planck/Tubingen, Germany²

Introduction and Objectives

The basolateral amygdala (BLA), medial prefrontal cortex (mPFC)—including its infralimbic (IL), prelimbic (PL), and anterior cingulate (ACC) sub-regions—and the dorsal hippocampus (dHPC) are critical brain structures involved in stress-related behavioral and neurobiological effects. Previous results show that 2-hour acute restraint stress (ARS) induces anxiety-like behavior and fear extinction deficit in rats 10 days post-stress. In this study we aim to investigate the role of *de novo* protein synthesis in the BLA 12 hours after ARS in the development of delayed anxiety-like behavior and fear extinction deficit, as well as related neurobiological changes in BLA-mPFC-HPC circuitry activity.

Methods and Results

Bilateral cannulas targeting the BLA were placed via stereotaxic surgery for intra-BLA anisomycin (protein synthesis inhibitor) administration in 29 adults male Wistar rats (CEUA-ICB 7618201021). Twelve hours after 2h-ARS, stressed and control rats received intra-BLA anisomycin (100 µg/µL, 0.5 µL/hemisphere). Ten days post-ARS, animals underwent the elevated plus maze (EPM). After 24h, all groups underwent Pavlovian-based contextual fear conditioning (CFC), followed by a 5-day extinction training protocol (10 min/session) and a 5-min extinction test on the 6th day. Animals were perfused 90 min post-extinction test for tissue fixation. δ FosB expression was visualized via immunofluorescence as a neuronal marker of cumulative activity. Statistical analysis was performed using one- or three-way ANOVA and custom Python scripts. We verified that anisomycin treatment 12h post-ARS prevented the ARS-induced decrease in open-arm exploration (STR-VEH vs STR-ANI, $P = 0.0014$), open-arm entries (STR-VEH vs STR-ANI, $P < 0.0001$) and the increase in anxiety index (STR-VEH vs STR-ANI, $P = 0.0001$) during EPM. When submitted to CFC, anisomycin treatment prevented the ARS-induced delayed fear extinction deficit (“Fear extinction X Acute stress X Anisomycin”: $P = 0.0086$). Also, anisomycin prevented the ARS-induced increase and decrease in BLA (STR-VEH vs. STR-ANI, $P < 0.0001$) and IL (STR-VEH vs STR-ANI, $P < 0.0189$) cumulative neuronal activity, respectively. Still, functional connectivity studies revealed that ARS induced a negative correlation between IL and dHPC CA1 (VEH vs STR-VEH, $P = 0.001$) and a positive correlation between IL and dHPC CA2 (VEH vs STR-VEH, $P = 0.002$). Both were prevented by intra-BLA anisomycin treatment 12h post-ARS ([IL vs CA1: STR-ANI vs STR-VEH, $P = 0.016$]; [IL vs CA2: STR-ANI vs STR-VEH, $P = 0.038$]).

Conclusion

In conclusion, *de novo* protein synthesis in the BLA 12 hours post-ARS is essential for the stress-induced anxiety-like behavior and delayed fear extinction deficits 10 days later, likely through mPFC and HPC circuitry remodeling.

Financial support: FAPESP 2021/13524-4, CNPq 120633/2019-1 and 422523/2016-0, and CAPES - Finance Code 001.

**DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGIA E
BIOFÍSICA**

AEROBIC TRAINING REDUCES MICROGLIAL ACTIVATION AND TNF α RELEASE IN THE HYPOTHALAMUS OF HYPERTENSIVE RATS

Gomes, P.M.; Pérego, S.M.; Antunes, V. R.; Michelini, L.M.

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Introduction and Objective: Spontaneously hypertensive rats (SHR) exhibit autonomic imbalance and blood-brain barrier (BBB) dysfunction, a pathophysiological condition that can be corrected by exercise training (T). Although microglia (MG) are not part of the BBB structure, they modulate its function through the synthesis/release of cytokines. In hypertensive condition, MG are activated releasing pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha (TNF α), which is able to break down different BBB constituents. Here we hypothesized that the benefit of exercise training to ameliorate BBB integrity in hypertensive rats could be due to reduced TNF α release by MG. Therefore, our objective is evaluate whether MG activation and TNF α release in the hypothalamus of SHR can be affected by T. **Methods and Results:** Wistar and SHR male rats (CEUA ICB/USP #3407080618) aged 90 days were divided into 4 groups: sedentary (W-S n=6) and trained Wistar (W-T n=6), sedentary (SHR-S n=6) and trained SHR (SHR-T n=6). T rats were submitted treadmill training (50%-60% of maximum capacity, 1 h/day, 5 days/week) or kept S for 4 weeks). At the end of protocols, the hypothalamus, brainstem and cortex were collected and processed for isolation of mononuclear cells, followed by flow cytometry analysis to evaluate MG and TNF α ⁺ labeling. Data as analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test. SHR-S vs. W-S exhibited elevated neuroinflammation degree and increased MG activation compared to normotensive subjects, (7.0 \pm 1.4% vs.0.65 \pm 0.39%, p<0.0001) and TNF α release (95.2 \pm 3.6% vs. 33.9 \pm 24.6%, p=0.0007). Increased performance gain was observed in both T groups. After training, SHR-T exhibited a reduction in hypothalamic MG activation attaining values similar to Wistar rats (CD45^{low}CD11b⁺, SHR-T: 0.55 \pm 0.26% vs. W-S:0.65 \pm 0.39% p=0.99; vs. W-T: 0.41 \pm 0.28% p=0.98; vs. SHR-S: 7.0 \pm 1.4% p<0.0001). TNF α release was reduced in hypothalamus of SHR-T (CD11b⁺TNF α ⁺, SHR-T: 59.4 \pm 17.0% vs. W-S: 33.9 \pm 24.6% p=0.15; vs. W-T: 41.9 \pm 4.6% p=0.6; vs. SHR-S: 95.2 \pm 3.6% p<0.01). SHR-S vs. W-S also exhibited higher MG activation and TNF α release in brainstem, but 4 weeks of training was not enough to reduce this condition. No difference was observed in the cortex. **Conclusion:** Exercise training of moderate intensity is efficient to reduce MG activation and consequently TNF α release in the hypothalamus of hypertensive rats, which could be one of the causes affecting the integrity of the BBB in neurogenic hypertension. **Financial Support:** FAPESP #2018/14544-6 #2022/07465-8.

PERFIL METABÓLICO E INFLAMATÓRIO PELA VIA TNF- α /TNFR1/TNFR2 EM CAMUNDONGOS BTBR *ob/ob*

ANGULO, V.M.D., de PONTE, M. C., THIEME, K., ROCHA, Y.R.S., da SILVA, L.B.

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biomédicas - USP

Introdução: Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um problema de saúde pública caracterizado pela resistência à insulina e hiperglicemia persistente. A doença renal diabética (DRD) é altamente prevalente em pacientes com DM2. Entretanto, sabe-se que pacientes diabéticos submetidos ao controle glicêmico ainda apresentam progressão da DRD, sugerindo a participação de outros mecanismos patológicos na disfunção renal, como a inflamação. Pacientes com DM2 podem apresentar níveis sistêmicos elevados de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , o qual atua em receptores TNFR1 e TNFR2. Investigar a ação dessa via inflamatória na progressão da DRD em pacientes com DM2 é essencial para compreender a fisiopatologia da disfunção renal nesse contexto. **Objetivo:** Avaliar o perfil metabólico, a função renal e a contribuição da via TNF- α /TNFR1/TNFR2 na DRD em machos e fêmeas em um modelo de DM2 associado à obesidade. **Métodos:** Camundongos BTBR foram acompanhados até a 8ª semana de vida. Amostras de urina e sangue foram coletadas para avaliação do perfil metabólico e função renal. **Resultados:** Machos BTBR *ob/ob* apresentaram níveis de glicose no sangue mais elevados do que as fêmeas *ob/ob*. Machos e fêmeas BTBR *ob/ob* mostraram aumento significativo do peso corporal quando comparados aos WT. Ademais, machos BTBR *ob/ob* exibiram níveis mais altos de triglicerídeos no soro do que as fêmeas obesas, mas os níveis de colesterol no soro foram igualmente aumentados em machos e fêmeas obesas. Não houve alterações significativas nos níveis de lactato e de creatinina entre os grupos, mas fêmeas *ob/ob* mostraram aumento dos níveis de ureia no soro em comparação às fêmeas WT. Fêmeas obesas apresentaram mais albuminúria do que os machos *ob/ob*. **Conclusão:** Os resultados indicam que os animais BTBR *ob/ob* apresentam características de DM2 e DRD com 8 semanas de vida. Apesar dos níveis mais reduzidos de glicose no sangue, os resultados sugerem que as fêmeas obesas apresentam maior disfunção renal do que os machos *ob/ob*. **Apoio financeiro:** FAPESP (2023/09403-2), CNPq (2023-2682) e Capes.

ANGIOTENSIN II, BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY AND MICROGLIA INTERPLAY DURING THE TRANSITION FROM PRE- TO HYPERTENSIVE PHASE IN SHR

Makuch-Martins, M., Morais, C. G. V., Pérego, S. M., Michelini, L. C., Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction: Chronic hypertension is characterized by upregulation of the renin-angiotensin system, increased blood-brain barrier permeability (BBBp), microglia (MG) activation within autonomic nuclei and sympathoexcitation. There is no information on the interplay of these events during the development of neurogenic hypertension. **Objectives:** We sought to identify the interaction and time-course changes of AngII availability, BBBp, MG activation and autonomic control during the transition from pre- to hypertensive phase in SHR. **Methods:** Hemodynamic/autonomic parameters (n=12 animals/group), BBBp (high+low molecular weight dyes injected i.a.; n=3 animals/group), MG and AngII expression (IBA-1 and AngII immunofluorescence, n=5 animals/group) and MG structural changes (NeurphologyJ, ImageJ) were evaluated within the paraventricular hypothalamic nucleus, nucleus of solitary tract and rostral ventrolateral medulla in SHR aged 4, 5, 6, 8 and 12 weeks (CEUA 6194060324). Age-matched Wistar rats were used as controls. Values are presented as mean±SEM, compared by 2-way factorial ANOVA. **Results:** At the 4th week SHR exhibited MAP (80±7 mmHg), BBBp (0.42±0.04 %area), MG density (1306±93 A.U.) and AngII expression (1718±85 A.U.) values and sympathetic activity like those of normotensive controls. Within the 3 nuclei augmented AngII density (on average +48%) was the first observed change at the 5th week followed by incipient BBB leakage (4%) and MG activation (+11%) at the 6th week. From 6 to 12 weeks BBBp increased continuously in SHR adding leaked plasma to locally synthesized AngII, the augmented peptide content strongly activated MG thus driving the blood pressure elevation and autonomic responses (increased sympathetic vasomotor activity and pressure variability) that occurred from the 8th week on. At the 12th week SHR reached the chronic phase of hypertension (152±4 mmHg) showing high values of AngII expression (6931±84 A.U.), BBBp (15.85±0.51% area), MG density (4312±292 A.U.) and robust sympathoexcitation (LF-SAP=15±2 mmHg²). These responses were not specific for autonomic nuclei also occurring, but with smaller magnitude in the somatosensory cortex and hypoglossal nucleus, indicating the predominance of hypertension-induced effects on autonomic areas. No changes were observed in age-matched controls where AngII density did not change. **Conclusion:** Our data indicated that brain-synthesized AngII is the initial stimulus to drive coordinated BBB permeability changes and MG activation. BBB leakage activates a vicious cycle in which augmented brain AngII availability further potentiates barrier permeability, MG activation, autonomic imbalance and pressure elevation during the establishment of hypertension. **Support:** FAPESP; CNPq; CAPES

REDUÇÃO DA GLICOSE NO CULTIVO DE CÉLULA ENDOTELIAL IMORTALIZADA PROMOVE AUMENTO DE SRC SEM AUMENTAR SUA ATIVAÇÃO

Autores: Assunção, H.C.R.¹, dos Santos, L. B.², Davel, A.P.², Rossoni, L.V.¹. ¹Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, USP; ²Departamento Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, UNICAMP.

Introdução: O cultivo celular é uma ferramenta útil para avaliação de mecanismos de sinalização celular de hormônios, fármacos ou compostos naturais. A linhagem EA.hy926 foi desenvolvida em 1983 por Edgell e colaboradores, por meio da hibridização de uma cultura primária de célula endotelial da veia umbilical humana (do inglês, HUVEC) com uma linhagem de A549, derivada de um carcinoma pulmonar humano. Essa célula manteve certas características endoteliais juntamente com imortalização da cultura, se tornando uma linhagem útil e com custo baixo de manutenção. O meio de cultura recomendado para manutenção dessa linhagem celular possui uma concentração de glicose de 25 mmol/L. No entanto, a concentração fisiológica de glicose no plasma é aproximadamente 5,5 vezes menor do que o utilizado nessa cultura. Esse aumento pode alterar vias intracelulares e ser um viés na análise de enzimas influenciadas pela glicose. Portanto, o presente trabalho avaliou os efeitos da redução de glicose nessa cultura na enzima tirosina quinase não receptor Src. **Métodos:** Células EA.hy926 foram cultivadas em DMEM/F12 com 5% SFB, com duas concentrações de glicose: 5 e 17,5 mmol/L; para melhor adaptação, foram mantidas por pelo menos 4 passagens. Ao longo do cultivo, as células foram contadas a cada repique, mantendo a concentração no subcultivo entre os meios. Além disso, estimou-se o tempo de duplicação da população (TDP) com esses valores. Após essa adaptação, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços com SFB tratado com carvão ativado e mantidas em estufa por 72h. Em seguida as células eram lavadas com meio sem SFB, e mantidas em privação de SFB durante a noite. No dia seguinte as células eram lisadas submetidas a Western Blot para detecção da expressão da Src, Src fosforilada no resíduo Tyr419 (Src^{Tyr419}, sítio de ativação) e β -actina (como controle interno). Os dados são expressos em média \pm EPM e analisados por teste-T de Student (não pareado). Protocolo CEP-ICB nº 1222/2022. **Resultados:** As células cultivadas com 5 mmol/L de glicose tiveram maior expressão da razão Src/ β -actina em comparação com aquelas em meio com 17,5 mmol/L ($1,13 \pm 0,07$ vs $0,71 \pm 0,04$, $p < 0,005$; respectivamente). Esse aumento não foi acompanhado de um aumento da razão de Src^{Tyr419}/Src. A concentração de glicose não influenciou o TDP das células. **Conclusão:** A redução de glicose aumentou a expressão de Src sem influenciar a sua fosforilação. Esse efeito pode ser benéfico nos futuros estudos do grupo, que visam detectar a fosforilação da Src induzida por ouabaína. **Apoio Financeiro:** FAPESP, CAPES e CNPq.

ESCORES POLIGÊNICOS PARA DOENÇA DE ALZHEIMER COMO PREDITORES DE ASPECTOS CLÍNICOS DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

Carlos O. C. A. Filho¹, Victor F. Oliveira¹, Gustavo Melo de Andrade Lima², Bruna S. da Silva², Eugenio H. Grevet⁴, Claiton H. Bau⁴, Diego L. Rovaris¹.

1 Instituto de Ciências Biomédicas - USP, Departamento de Fisiologia e Biofísica

2 Universidade Federal de São Paulo

3 Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

4 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Introdução e Objetivos: O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) trata-se de uma condição do neurodesenvolvimento que causa prejuízo no indivíduo em diversos contextos. Estudos de varredura genômica (GWAS) já associaram vários pontos no genoma relacionados a essa condição, revelando mecanismos biológicos em comum com outros transtornos psiquiátricos e endofenótipos cerebrais, porém menos associados a doenças neurológicas. Consoante a este padrão, não foi encontrada correlação genética significativa entre TDAH e doença de Alzheimer (DA) em pesquisas passadas. No entanto, estudos de coorte com grande poder estatístico indicam risco aumentado de demência em familiares de indivíduos com TDAH. Dessa maneira, este projeto buscou avaliar a influência que o controle genético associado à DA tem sobre a apresentação clínica do TDAH persistente em adultos.

Métodos e Resultados: Como amostras base, utilizamos as maiores e mais recentes estatísticas sumárias das meta-análises de GWAS de TDAH, com N = 225.534 e de DA, com N = 788.989 e como amostra alvo, uma amostra clínica independente do Brasil, altamente caracterizada para TDAH e controles, com N = 1.660. Assim, após ambas as amostras passarem por um controle de qualidade, foi conduzida uma análise de escore de risco poligênico (PRS) utilizando a metodologia de PRS-CS (*Continuous Shrinkage*). Não detectamos uma relação entre o PGS para DA sobre o TDAH (caso-controle). Também não encontramos uma influência desse PRS sobre a sintomatologia do TDAH. Neste resultado preliminar, não significa que a associação não exista, levando a uma discussão sobre os dados utilizados, como, por exemplo, a constituição genotípica distinta entre a população brasileira (rica em miscigenação) e a europeia (pouco miscigenada) - levando uma grande diferença na frequência das variantes e, assim, interferindo nos resultados.

Conclusão: Os resultados preliminares desse estudo não demonstraram relação biológica e nem poder preditivo entre os desfechos, uma vez que não foi significativa a associação entre o PRS de DA e o TDAH. No entanto, com as amostras atuais, ainda há outras análises imediatas a serem consideradas, como a relação entre PRS de demência (geral) sobre o TDAH, o nível de correlação genética global e local e busca de relações causais entre fatores de risco dos desfechos a partir de randomizações mendelianas.

Financiamento: Programa Unificado de Bolsas (PUB - USP), CNPq e FAPESP.

ESCORES POLIGÊNICOS PARA MARCADORES DE FERRO E IMPLICAÇÕES NO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

Thales Vieira Rodrigues¹, Yago Carvalho Lima¹, Cibele E. Bandeira¹, Bruna S. da Silva², Maria Eduarda Tavares³, Eugenio H. Grevet³, Claiton H. Bau³, Diego L. Rovaris¹.

1 Instituto de Ciências Biomédicas - USP, Departamento de Fisiologia e Biofísica

2 Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

3 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Introdução e Objetivos: O ferro é essencial para o desenvolvimento e a função adequada do cérebro, particularmente em funções cognitivas como atenção e memória. A deficiência de ferro durante o neurodesenvolvimento aumenta o risco de transtornos neuropsiquiátricos, como o TDAH. Estudos de associação genômica ampla (GWAS) identificam variantes genéticas e vias biológicas associadas ao TDAH e aos níveis de marcadores de ferro. As estatísticas sumárias desses estudos podem ser usadas para calcular escores poligênicos (PGS), que avaliam o risco genético de desenvolver certos traços com base em sua composição genética. Nesse sentido, este projeto visa testar a hipótese de que o controle genético relacionado ao metabolismo do ferro, captado a partir de PGSs, influencia o risco e a apresentação clínica do TDAH persistente.

Métodos e Resultados: Como amostra base, foram utilizados dados dos maiores GWAS para TDAH e marcadores de ferro. Como amostra alvo, utilizamos 665 casos de TDAH e 995 controles. Ambas as amostras foram submetidas a um controle de qualidade e os PGSs foram calculados para quatro marcadores do metabolismo de ferro (TIBC, TSAT, ferro sérico e ferritina). Em seguida, por meio de regressões logísticas binárias, a associação entre os PGSs e o TDAH foi testada. Os resultados obtidos demonstraram associações nominais entre os PGSs de ferro sérico (OR = 0,86; P = 0,014), ferritina (OR = 0,85; P = 0,040), TSAT (OR = 0,88; P = 0,031) e o diagnóstico de TDAH.

Conclusão: Nosso estudo contribui para um maior entendimento da relação dos níveis de marcadores de ferro sobre o TDAH ao indicar um efeito do PGS para esse marcadores no TDAH, no entanto, os próximos passos envolvem entender se esses efeitos se dão por pleiotropia vertical ou horizontal. Além disso, pretendemos investigar a relação desses PGSs com o curso clínico e gravidade do TDAH.

Financiamento: CNPq, FAPERGS, FAPESP

AVALIAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR AÓRTICO EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

Gonçalves, A.K.S.¹, Reis Costa, D.¹, Freitas, I.N.², Davel, A.P.², Rossoni, L.V.¹

¹Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. ²Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

Introdução: O tecido adiposo perivascular é uma estrutura adiposa que reveste a maioria dos vasos sanguíneos, importante na regulação do tônus vascular. A liberação predominante de fatores vasodilatadores do PVAT, configura seu efeito anticontrátil fisiológico. Entretanto, esse efeito está prejudicado em modelos de hipertensão arterial (HA) primária. Um dos principais modelos de HA secundária é o dois rins-um clipe (2R1C), o qual se assemelha aos pacientes com HA renovascular. A aorta torácica (AO) de animais 2R1C apresenta disfunção endotelial e vascular associado ao estresse oxidativo em diferentes estágios da HA. Mesmo sabendo da importância do PVAT na modulação vascular, a sua participação modulando a reatividade aórtica na HA 2R1C ainda é desconhecida. **Objetivo:** Assim, nosso objetivo foi investigar o perfil vasoativo e estrutural do PVAT da AO (PVAT_t) 2 ou 6 semanas (s) pós a indução da HA 2R1C. **Métodos:** Para isso, foram utilizados camundongos machos C57BL/6 (CEUA: 6455090821), divididos em quatro grupos: falsos operados (SO) ou submetidos à clipagem da artéria renal (2R1C) após 2s ou 6s. A pressão arterial (PA) foi aferida por pletismografia de cauda. Segmentos de AO com (+) ou sem (-) PVAT_t foram montados no miógrafo de arame e realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE). Realização da avaliação histológica (coloração HE) e da produção de espécies reativas de oxigênio (sonda fluorescente DHE) no PVAT_t. Estatística: Teste-*t* ou ANOVA (2-vias), valores foram expressos como média±EPM; *p*<0,05 *vs. PVAT₋, #vs. SO. **Resultados:** Observou-se aumento progressivo da PA após 2s ou 6s nos grupos 2R1C vs. SO. A vasoconstrição à FE foi menor em anéis PVAT_{t+} vs. PVAT_{t-} em ambos os grupos (SO e 2R1C) após 2s ou 6s. Nos anéis PVAT_{t+}, a resposta à FE foi maior no grupo 2R1C vs. SO, de ambas as idades (E_{max}: 2s, 22% de aumento; 6s, 26% de aumento, *n*=6-10). O inibidor não seletivo da NO sintase (NOS) L-NAME aumentou a E_{max} e a *pD*₂ à FE em anéis PVAT_{t-} e PVAT_{t+} nos grupos SO e 2R1C; abolindo a diferença observada nos anéis PVAT_{t+} entre os grupos de mesma idade. Somente na 6^ªs de HA 2R1C, foi observado redução no peso do PVAT_t, maior deposição lipídica e estresse oxidativo no PVAT_t. **Conclusão:** Assim, conclui-se que a disfunção do PVAT_t está associada a NOS e ocorre independente do estágio hipertensivo; por sua vez o estresse oxidativo, a perda de massa e o branqueamento do PVAT_t ocorre posterior a estabilização da HA. **Apoio financeiro:** Capes, CNPq e FAPESP.

LIGAÇÕES PLEIOTRÓPICAS EM VEZ DE CAUSAIS ENTRE NÍVEIS DE CORTISOL E TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

João K. N Ramos¹, Iago Junger-Santos¹; Nicolas P. Ciochetti¹; Cibele E. Bandeira¹; Maria Eduarda Tavares²; Bruna S. da Silva^{1,2}; Eduardo S. Vitola^{1,2}; Luis A. Rohde^{2,3,4}; Eugenio H. Gravet^{2,3}; Claiton H Dotto Bau^{2,3,5}, and Diego L Rovaris¹.

1. Laboratório de Genômica Fisiológica da Saúde Mental (PhysioGen Lab), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; 2. Programa Ambulatorial de TDAH & Programa de Psiquiatria do Desenvolvimento, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil; 3. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Departamento de Psiquiatria, Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento, Porto Alegre, RS, Brasil; 4. Conselho Médico UniEduK, Brasil; Instituto Nacional de Psiquiatria do Desenvolvimento & Centro Nacional de Inovação e Pesquisa em Saúde Mental, Brasil; 5. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo

Introdução e Objetivos: O estresse está implicado no TDAH, mas a relação causal ainda é motivo de debate. Embora os resultados de meta-análises sugiram que os níveis de cortisol se correlacionam com o transtorno, a heterogeneidade dos estudos individuais exige mais investigações. A partir de abordagens pós-GWAS (genome-wide association study), nós examinamos a conexão entre a variabilidade do cortisol matinal e o TDAH.

Métodos e Resultados: Utilizando dados sumarizados de grandes GWAS (cortisol, n=25.314; TDAH, n=225.543), empregamos sete métodos de Randomização Mendeliana para inferência causal. Além disso, avaliamos correlações genéticas globais e locais e aplicamos o método conjFDR para detectar variantes genéticas pleiotrópicas. Também, conduzimos uma análise de escore poligênico (PGS) em uma amostra clínica independente e altamente caracterizada de TDAH e controles (n=1.660). Encontramos evidências de pleiotropia generalizada em vez de causalidade. As correlações genéticas locais identificaram duas regiões genômicas (cromossomos 5 e 22), com uma mostrando uma correlação positiva e a outra exibindo uma correlação negativa. Essas regiões abrigam genes fortemente associados a traços psiquiátricos (por exemplo, RASGRF2 e TRIOBP). O conjFDR revelou um SNP independente (rs28406364) associado conjuntamente com TDAH e níveis de cortisol. Nossa análise de PGS revelou associações entre o PGS para níveis de cortisol e a comorbidade entre TDAH e comportamento externalizantes (uso de substâncias, transtorno de conduta e transtornos desafiadores de oposição) apenas no grupo de ancestralidade europeia. Ajustando para transtornos psiquiátricos, observamos uma associação com o diagnóstico de TDAH, com casos exibindo uma menor PGS para cortisol. **Conclusão:** Nosso estudo contraria uma relação causal do TDAH sobre os níveis de cortisol e vice e versa. Em vez disso, nossos achados sugerem interconexões complexas entre TDAH e a variabilidade nos níveis de cortisol a partir de efeitos pleiotrópicos. Além disso, a direção observada do PGS para cortisol no TDAH alinha-se com os resultados de uma meta-análise de medidas de cortisol.

Financiamento: CAPES, CNPq e FAPESP

O BLOQUEIO DA NEUROINFLAMAÇÃO IMPACTA POSITIVAMENTE EM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE ALZHEIMER

Meira M., Ferreira A.F.F., Britto, L.R.G. Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: A Doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pelo depósito de placas senis, pelos emaranhados neurofibrilares e por neuroinflamação. Pesquisas recentes utilizando a técnica de triagens fenotípicas revelaram uma nova molécula, denominada AD-16, descrita como um inibidor efetivo da neuroinflamação. Neste estudo, avaliamos os possíveis efeitos benéficos do AD-16 em camundongos triplo-transgênicos (3xTg), frequentemente usados como modelos de DA.

Métodos e Resultados: Foram utilizados camundongos 3xTg e PSEN (usados como controles), machos, com cinco meses de idade. Os animais foram divididos de forma randomizada em quatro grupos (n=11-12/grupo), a saber: 1. PSEN + VEI; 2. 3xTg + VEI; 3. PSEN + AD-16; 4. 3xTg + AD-16. O tratamento com o AD-16 foi realizado por 21 dias consecutivos, com administração via gavagem. Nos cinco últimos dias de tratamento foram realizados o Teste de Reconhecimento de Objeto (RO) e o teste da Esquiva Passiva. Também foi realizada a imuno-histoquímica com anticorpo primário para a detecção do peptídeo β -amiloide 1-16.

Na primeira fase do RO, os animais tiveram uma preferência nítida pela periferia da arena (n=11-12/grupo, $F(1,41)=34,067$; $p<0,001$). Além disso, a distância percorrida pelos animais PSEN foi significativamente maior do que para os animais 3xTg, indicando um perfil exploratório e locomotor menor nos animais 3xTg (n=11-12/grupo, $F(3,44)=99,110$; $p<0,001$). No teste RO, o grupo 3xTg + VEI (n=9) teve o maior déficit cognitivo, com diferenças significativas entre as etapas de memória de curta duração e longa duração, ocorrendo uma piora no índice de discriminação 24 horas depois da aquisição ($p=0,018$). Na memória de longa duração, este grupo também apresentou um desempenho inferior em comparação com o grupo PSEN + VEI (n=11; $p=0,036$). Também na memória de longa duração, o grupo 3xTg + AD-16 (n=10), apresentou melhor desempenho em comparação ao grupo 3xTg + VEI, indicando um possível impacto positivo do tratamento ($p=0,012$). Na Esquiva Passiva, os animais PSEN tiveram um desempenho inferior no teste em relação aos animais 3xTg, mas que pode ser associado ao perfil ativo observado nos animais PSEN (n=11-12/grupo, $F(41,3)=35,998$ e $p<0,001$). Na imuno-histoquímica, a marcação para o peptídeo β -amiloide 1-16 só foi observada nos animais 3xTg (n=6/grupo, $F(3,23)=32,188$; $p<0,001$). Além disso, o tratamento com AD-16 reduziu essa marcação nos animais do grupo 3xTg + AD-16 ($p<0,001$).

Conclusão: Estes resultados sugerem uma neuroproteção produzida pelo AD-16 no modelo triplo-transgênico da DA, possivelmente pelo seu impacto anti-inflamatório no sistema nervoso.

Apoio Financeiro: Programa Unificado de Bolsas de Estudos para Apoio à Formação de Estudantes de Graduação (PUB)- USP, FAPESP, CNPq e CAPES.

DISFUNÇÃO DO PVAT AÓRTICO NÃO PRECEDE AUMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL E ESTÁ ASSOCIADA A MENOR DISPONIBILIDADE DE ÓXIDO NÍTRICO EM SHR

Curcio, B.M., Felisbino, T.G., Dardi, P., Rossoni, L.V.

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas - USP/SP

Introdução e Objetivos

O tecido adiposo perivascular (PVAT), que circunda a maioria dos vasos sanguíneos, participa da regulação do tônus vascular e exerce, em condições fisiológicas, um efeito anticontrátil. Por outro lado, em enfermidades, como na hipertensão arterial (HA), o PVAT se encontra disfuncional. Um dos principais modelos experimentais de HA são os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) que, desde a fase pré-hipertensiva, apresentam diversas alterações cardiovasculares, incluindo o remodelamento vascular. A disfunção do PVAT aórtico já foi demonstrada em SHR na fase adulta, com o quadro de HA estabelecido, sendo associada a: redução de agentes vasodilatadores, acúmulo de células imunes e branqueamento do tecido. Contudo, até o momento, pouco se sabe sobre a função do PVAT na fase pré-hipertensiva. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a função do PVAT aórtico nas fases pré-hipertensiva e hipertensiva dos SHR, buscando compreender os mecanismos envolvidos.

Métodos e Resultados

Para isso, foram utilizados ratos Wistar e SHR em duas idades, 6 semanas e 5 meses (6s e 5m, respectivamente; CEUA: 119/2016 e 3041240723). A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida por pletismografia de cauda. Anéis de aorta torácica com (+) ou sem (-) PVAT foram montados em miógrafo de arame e curvas concentração-resposta à fenilefrina (FE) foram realizadas na presença ou ausência de inibidores da NO sintase (L-NAME) e do NFKB (PDTC). A expressão proteica foi avaliada por *Western Blot*. Estatística: ANOVA-2 vias. Em 6s, não houve diferença significativa na PAS entre ambos os grupos; já em 5m, os SHR apresentaram um aumento significativo de PAS em relação aos Wistar de mesma idade e aos grupos 6s. A presença do PVAT atenuou a contração induzida por FE nos grupos 6s; enquanto em 5m, apenas o grupo controle manteve o efeito anticontrátil preservado nos anéis PVAT+. A incubação com L-NAME exerceu um efeito de menor magnitude nos anéis PVAT+/SHR-5m quando comparado com respectivo Wistar; enquanto a incubação com PDTC gerou uma redução significativa da contração induzida por FE em anéis PVAT+/SHR-5m. A expressão da NO sintase endotelial (eNOS), UCP-1, NFKB e seu inibidor (IKB) não diferiu entre os grupos 6s; enquanto em 5m, o PVAT dos SHR, quando comparado com Wistar de mesma idade, apresentou redução significativa da razão dímero/monômero da eNOS e da expressão de UCP-1, e aumento da razão NFKB/IKB.

Conclusão

A disfunção do PVAT aórtico não precede a elevação dos níveis pressóricos, sendo uma consequência do quadro hipertensivo, e está associada à redução da biodisponibilidade de NO, à presença de um quadro pró-inflamatório e ao branqueamento do tecido.

Apoio Financeiro: FAPESP, CNPq e CAPES.

PAPEL DO ESCORE DE RISCO POLIGÊNICO PARA IDEAÇÃO SUICIDA SOBRE DIFERENTES APRESENTAÇÕES SINTOMATOLÓGICAS DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

Folego-Temoteo, I.¹; Bandeira, C. E.¹; Silva, B. S.²; Grevet, E. H.³; Bau, C. H.³, Rovaris, D. L.¹

¹ Instituto de Ciências Biomédicas - USP, Departamento de Fisiologia e Biofísica

² Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

³ Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Introdução e Objetivos:

Assim como o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), comportamentos suicidas (CSs), como a ideação suicida (IS), sofrem influência multifatorial, onde, tanto fatores inatos (genéticos e fisiológicos) quanto fatores ambientais interferem no seu desenvolvimento. Indivíduos com TDAH apresentam uma chance muito maior de apresentarem CSs do que a população geral. A partir de dados de varredura genômica (GWAS) é possível calcular escores poligênicos (PGS) que podem ser aplicados para avaliar o risco biológico que um indivíduo tem de desenvolver certos fenótipos. O presente trabalho teve por objetivo testar se o PGS calculado para ideação suicida auxilia na predição das diferentes apresentações sintomatológicas do TDAH (Desatenção, Hiperatividade, Impulsividade e TDAH total).

Métodos e Resultados:

Para o cálculo do PGS para IS foi utilizado o banco de estatísticas sumárias do mais recente estudo de GWAS para este fenótipo, que contou com 99.814 casos e 512.567 controles. Um rigoroso controle de qualidade dos dados foi implementado retirando variantes raras, ambíguas, duplicadas e presentes nos cromossomos sexuais. Para gerar o PGS, foi utilizado o software PRS-CS que, por meio do método de encolhimento contínuo, atualiza os tamanhos de efeito das variantes genéticas e ajusta o escore com base no sinal de associação de cada marcador. O escore gerado foi aplicado na amostra alvo (665 casos e 995 controles), e por meio de regressões lineares, a associação entre o escore e as diferentes apresentações de TDAH foi testada. Os resultados obtidos demonstraram associações significativas e positivas (diretas) entre este escore e os sintomas de hiperatividade ($P = 0,049$), hiperatividade/impulsividade ($P = 0,036$) e TDAH total ($P = 0,025$) tanto quando testado na amostra total, quanto no subconjunto de ancestralidade europeia ($P = 0,022$; $P = 0,030$; e $P = 0,026$, respectivamente).

Conclusão:

Considerando a correlação clínica e genética entre o TDAH e os CSs já estabelecida na literatura científica, o presente estudo contribui ainda mais para o entendimento da relação biológica entre o TDAH e os CSs. Os resultados encontrados indicam uma possível influência das variantes genéticas relacionadas com a ideação suicida sobre os sintomas de TDAH, de hiperatividade, impulsividade e combinado (hiperatividade/impulsividade). Novas metodologias serão empregadas a fim de compreender melhor se essa relação trata-se de uma pleiotropia vertical ou horizontal.

Financiamento: CNPq, FAPESP e CAPES.

KNOCKOUT OF THE TRPM2 CHANNEL ALLEVIATES NEURODEGENERATION AND NEUROINFLAMMATION IN FEMALE AND MALE MICE INDUCED TO A PARKINSON'S DISEASE MODEL

Ferreira, A.F.F.; Britto, L.R.

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction and Aims

The Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2) is a calcium channel expressed in a variety of cellular types, including neurons and microglia. This channel was previously shown to be involved in cellular death and microglia activation in other diseases. However, its role in Parkinson's disease (PD), a neurodegenerative disease and movement disorder, has not been fully explored. Our aim was to assess the impact of TRPM2 knockout in male and female mice induced to the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) PD model.

Methods and Results

For the PD model induction, *Trpm2* partial and complete knockout, three-months-old male and female mice, underwent stereotaxic surgery for 6-OHDA administration in the right striatum (CEUA #8395080420). Brains were collected and sliced on day 7. Sections containing the substantia nigra pars compacta were stained for markers of dopaminergic neuron (tyrosine hydroxylase, TH) and microglia (Iba-1 and CD68). The number of TH-positive cells and optical density of Iba-1 and CD68 were analyzed in ImageJ. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's posttest was used ($p \leq 0,05$). A reduction in TH-positive cells was noted in wild-type 6-OHDA-injected male [$F(31,3)=142.14$, $p<0.0001$] (-56%, $p<0.001$) and female [$F(31,3)=149.75$, $p<0.0001$] (-51%, $p<0.001$) when compared to control mice, validating the 6-OHDA-mouse model of PD. However, a reduced dopaminergic neuron loss was observed in partial and complete *Trpm2* knockout male (partial -30%, $p<0.001$, complete -1%, $p<0.001$) and female mice (partial -33%, $p<0.001$, complete -5%, $p<0.001$). We also evaluated the neuroinflammatory aspect of PD by measuring the optical density of Iba-1 staining, a microglial marker. An increase in microglia density was observed in wild-type 6-OHDA-injected male [$F(31,3)=16.71$, $p<0.0001$] (+211%, $p<0.001$) and female [$F(31,3)=15.46$, $p<0.0001$] (+156%, $p<0.001$) mice, as expected. While partial and complete *Trpm2* knockout mice exhibited lower Iba-1 staining density, compared to wild-type animals, in both male (partial +65%, $p<0.001$, complete +28%, $p<0.001$) and female (partial +86%, $p<0.001$, complete +31%, $p<0.001$) mice induced to the PD model. To confirm the activated state of microglia, the CD68 marker, a lysosomal protein expressed by microglia, was also assessed. The increase in cells labeled with Iba-1 and CD68 in 6-OHDA-injected wild-type mice was not observed in the *Trpm2* knockout animals.

Conclusion

Trpm2 genetic deletion is neuroprotective and reduces neuroinflammation in male and female mice induced to the 6-OHDA animal model. These results highlight the TRPM2 calcium channel as a possible therapeutic target for PD.

Funding

FAPESP (contracts #2022/14820-9, #2022/14846-8, #2020/02109-3), CNPq and CAPES.

A ESTREPTOZOTOCINA ALTERA O METABOLISMO E A MORFOLOGIA NEURONAL: IMPLICAÇÕES PARA O ESTUDO DAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Maiolo, M.L.D.¹, Cardinali, C.A.E.F.², Torrão, A.S.³, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: A estreptozotocina (STZ), comumente utilizada para produzir modelos experimentais de diabetes, pode induzir mudanças que se assemelham à doença de Alzheimer esporádica (DAE) quando administrada intracerebroventricularmente, tornando-se um interessante modelo para doenças neurodegenerativas. No entanto, os mecanismos de ação da STZ em células neuronais permanecem pouco conhecidos. Este estudo tem por objetivo investigar como a STZ (5mM) por 2, 24 e 48 horas impacta o metabolismo e a morfologia de uma linhagem de neuroblastoma (Neuro-2a). **Métodos e Resultados:** A morte celular e a atividade metabólica foram avaliadas por meio dos ensaios de azul de Tripán e MTT (tetrazólio), respectivamente. A morfologia celular foi examinada utilizando microscopia óptica e analisada com o software ImageJ - pacote FIJI. A morte celular aumentou em 8,19% ($p < 0,01$) comparado ao controle após 48 horas. Além disso, a contagem total de células diminuiu durante o tratamento: 24,57% em 2 horas ($p < 0,01$), 56,05% em 24 horas ($p < 0,001$) e 78,2% em 48 horas ($p < 0,001$), comparado ao controle. O tratamento de 48 horas com STZ reduziu a atividade metabólica das células Neuro-2a em 43,02% ($p < 0,01$). A análise morfológica demonstrou alterações significativas causadas pelo tratamento com STZ. Após 24 horas, houve um aumento substancial tanto na área celular (31,03%, $p < 0,001$) quanto no tamanho da extensão dos neuritos (129,48%, $p < 0,0001$) comparado ao controle. A extensão dos neuritos continuou a crescer em 48 horas (214,13%, $p < 0,0001$) comparado ao controle. Diferenças significativas semelhantes foram observadas entre 2 horas e 48 horas ($p < 0,0001$), bem como entre 2 horas e 24 horas. **Conclusões:** Nossos achados destacam o perfil citotóxico da STZ e sugerem seu potencial em induzir mudanças celulares semelhantes às observadas em doenças neurodegenerativas, bem como um modelo adequado para o estudo de desenvolvimento de intervenções terapêuticas.

Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), 2021/12620-0 e 2023/14160-1.

ANÁLISE DO DIMORFISMO SEXUAL NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA E NO METABOLISMO DE GLICOSE HEPÁTICO E RENAL EM CAMUNDONGOS BTBR *ob/ob*

ROCHA, Y.R.S., THIEME, K., de PONTE, M.C., ANGULO, V.M.D., da SILVA, L.B.
Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introdução: O diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) é uma doença crônica frequentemente associada à obesidade. DMT2 é caracterizado por hiperglicemia resultante da resistência à insulina, a qual é essencial para a regulação de vias metabólicas em vários tecidos, como fígado e rins. Além disso, sabe-se que a prevalência de DMT2 é maior em homens do que em mulheres, apesar dessas serem mais propensas à obesidade. Isso indica uma contribuição do sexo biológico na fisiopatologia dessas disfunções metabólicas. **Objetivo:** Investigar o dimorfismo sexual na sinalização da insulina e no metabolismo da glicose no fígado e nos rins de camundongos BTBR *ob/ob*, com foco nas diferenças fisiopatológicas do DMT2 entre machos e fêmeas. **Métodos:** O estudo utilizou camundongos machos e fêmeas BTBR *ob/ob* e controles WT de 16 semanas para a análise do perfil metabólico e da expressão gênica e proteica em fígado e rins. **Resultados:** Machos e fêmeas *ob/ob* apresentaram aumento do peso corporal em relação aos respectivos WT. Entretanto, o aumento dos níveis de glicose no sangue foi maior nos machos do que nas fêmeas *ob/ob*. Apenas as fêmeas obesas mostraram aumento significativo na concentração de insulina no soro. No fígado, a expressão do receptor IGF-1 β foi maior nos obesos, independente do sexo, mas a fosforilação da AKT (s473) só foi observada nas fêmeas *ob/ob*. A fosforilação da GSK3 também pareceu ser maior apenas nas fêmeas obesas, embora o resultado não seja estatisticamente significativo. Os níveis de transcritos de *pkm* no fígado foram maiores nas fêmeas obesas em relação aos machos obesos. A expressão gênica de *pck1* foi diminuída somente nas fêmeas obesas, enquanto que apenas os machos *ob/ob* apresentaram aumento dos níveis de transcritos para *fbp1*. Nos rins, a expressão gênica de *pfkp* e *pkm* foram aumentadas nas fêmeas obesas em comparação aos machos *ob/ob*. Os níveis de transcritos para *pck1* foi maior nos machos obesos em comparação às respectivas fêmeas. **Conclusão:** O sexo biológico interfere na sinalização da insulina e no metabolismo de glicose hepático e renal. Esses achados podem explicar parcialmente a diferença dos níveis de glicose no sangue observada entre machos e fêmeas com DMT2 e obesidade. **Apoio financeiro:** FAPESP (2024/01229-6 e 2023/09403-2), Capes e CNPq.

DESFECHOS FUNCIONAIS E MOLECULARES NO CORAÇÃO DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM TRIIODOTIRONINA ASSOCIADA A MEIA DOSE DE INSULINA (3U).

Marcelo, H.I.¹, Campos, J.M.¹, Florido Neto, A.R.¹, Couto, G.K.¹, Rossoni, L.V.¹, Nunes, M.T.¹

¹Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

Introdução: A diabetes mellitus (DM) tem sido associada a riscos cardiovasculares e ao desenvolvimento de hipotireoidismo. Estudos recentes revelaram que o tratamento de ratos induzidos à DM com T3 em combinação com metade da dose fisiológica de reposição de insulina (3U, s.c.) restaurou a glicemia e o TSH sérico para valores semelhantes aos do grupo Controle (C). **Objetivo:** A fim de reconhecer os desfechos cardíacos em resposta a esse tratamento, o presente estudo buscou analisar a função cardíaca e a expressão proteica do coração de ratos induzidos à DM por aloxana e tratados com T3 associado à insulina (3U). **Métodos:** 96 ratos *Wistar* machos foram divididos em grupos controle (C); diabético (DM), (induzido por aloxana 150 mg/kg); DM tratado com insulina 3U, s.c. (DMI3U) ou T3 (1,5µg/100g, i.p.- DMT3) e T3 mais insulina (DMT3I). Após 3 semanas de tratamento, a glicose sanguínea e a taxa de decaimento da glicose foram avaliadas. Ao fim da quarta semana, os ratos foram então anestesiados (uretana, 1,6mg/kg, i.p.) e submetidos a cateterismo para análises hemodinâmicas em repouso. Posteriormente, os ratos foram eutanasiados e a expressão das proteínas-alvo do T3 foi analisada por *Western Blotting*. Este estudo foi realizado de acordo com as normas do CEUA (103/2016). **Resultados:** Os ratos DM apresentaram hiperglicemia e resistência à insulina em comparação com C. O grupo DM apresentou aumento da pressão arterial diastólica (PAD). O grupo DMT3I demonstrou resultados hemodinâmicos semelhantes ao grupo C, com exceção da diminuição da pressão diastólica inicial do ventrículo esquerdo (PDiVE). O grupo DM apresentou redução de GLUT4 e todos os tratamentos mantiveram a expressão a nível C. A expressão de MHC- α e MHC- β foi semelhante entre todos os grupos, no entanto o tratamento com T3 isolado aumentou a expressão de MHC- α vs. DM e C. A razão SERCA/fosfolambano foi reduzida no grupo DM e o grupo DMT3I manteve-a em nível controle. Não houve diferença no conteúdo de fosfolambano fosforilada, α_1 Na⁺/K⁺ATPase, β_1 -AR e β_2 -AR. O grupo DM teve aumento da expressão de β_3 -AR e o grupo DMT3I normalizou a expressão deste receptor à nível C. A razão BAX/Bcl-2 foi aumentada nos ratos DM e reduzida aos níveis de C no grupo DMT3I. Além disso, esse tratamento reduziu expressão de caspase-9 em comparação com DM. **Conclusão:** a associação de T3 com insulina (3U) foi capaz de restaurar a glicemia, preservando os ventrículos, a hemodinâmica, a expressão de proteínas funcionais e de viabilidade celular do coração de ratos diabéticos. **Apoio financeiro:** PROEX (001) e FAPESP (2022/11974-5).

AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL AÇÃO INIBITÓRIA DO COMPOSTO AD-16 NA NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON
Bianchetti, M.E., Ferreira, A.F.F., Britto, L.R., Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introdução e Objetivos

A Doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos na região da substância negra pars compacta (SNc) do cérebro, manifestando-se em sintomas motores e não-motores. Um elemento crítico desta patologia é a neuroinflamação, que desencadeia um ciclo neurotóxico prejudicial, exacerbando a morte celular dentro do sistema nervoso central. O AD-16 é um composto recentemente identificado capaz de reduzir a expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias, enquanto aumenta a expressão de certas citocinas anti-inflamatórias em modelos induzidos e genéticos de Doença de Alzheimer. Conseqüentemente, este estudo busca compreender o impacto potencial da administração oral do AD-16 na mitigação da neuroinflamação na DP e na progressão subsequente da doença.

Métodos e Resultados

A toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) foi empregada para induzir o modelo de DP em camundongos machos C57BL/6. Testes comportamentais de rotação induzida por cilindro e apomorfina foram realizados para avaliar o comportamento motor (n=45), e técnicas de imuno-histoquímica foram utilizadas com um anticorpo primário para a tirosina hidroxilase (TH), que marca neurônios dopaminérgicos e para Iba-1, que marca microglia (n=20). Todos os animais e procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética institucional, de acordo com o protocolo 6567270123*. Os resultados dos testes comportamentais revelam uma melhora na função motora dos animais tratados, exibindo maior utilização dos membros contralaterais pós-tratamento em comparação com o grupo não tratado no teste do cilindro ($p < 0,001$) e um número reduzido de rotações induzidas por apomorfina ($p < 0,001$). Os resultados dos ensaios de imuno-histoquímica demonstram um aumento no número de células positivas para TH na SNc ($p = 0,003$) e na densidade integrada de TH no estriado (CPu) ($p = 0,04$). Na análise morfológica por esqueletonização das células microgлияis marcadas por Iba-1 foi constatado que houve um aumento do número de *endpoints* ($p = 0,03$) e de tamanho das ramificações no CPu ($p = 0,02$), ambos por célula. Esses resultados demonstram uma possível mudança da microglia ao seu estado de repouso. Já na SNc, o efeito anti-inflamatório do AD-16 foi menos evidente, visto que não houve aumento significativo nesses parâmetros nesta região ($p = 0,36$ e $p = 0,456$, respectivamente).

Conclusão

O AD-16 surge como um composto com potencial significativo para modulação negativa da neurodegeneração. Experimentos adicionais serão realizados para determinar se a forma como o AD-16 reduz a neurodegeneração na DP realmente envolve processos inflamatórios.

Apoio Financeiro

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), CNPq e CAPES.

“ATIVAÇÃO NEURONAL INDUZIDA POR ESTÍMULO HIPEROSMÓTICO ENVOLVE SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA ENTRE OCVs E PVN DE RATOS”. Oliveira¹ G.A., Gomes² P.M., e Antunes³ V.R., Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-1) da Universidade de São Paulo (USP).

Introdução e Objetivos: Algumas doenças cardiovasculares podem estar relacionadas a uma dieta rica em sal, sendo uma delas a hipertensão arterial neurogênica. Apesar de haver muitos estudos neste campo, ainda há lacunas para se entender os atores envolvidos na neurotransmissão entre núcleos hipotalâmicos e bulbares que participam do controle neural da circulação, frente a estímulos hiperosmóticos com sobrecarga de sal. Há mais de uma década, nosso laboratório publicou uma série de trabalhos que demonstram claramente que a sobrecarga de sal ativa neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e que o nucleotídeo trifosfato de adenosina (ATP) é um dos neurotransmissores envolvidos na excitabilidade neuronal nas vias simpatoexcitatórias e de aumento da pressão arterial. Uma questão recentemente respondida por nosso laboratório foi sobre a fonte de ATP, evidenciamos a proveniência desta purina das células da glia do PVN. A nossa hipótese neste estudo é de que haveria também uma outra fonte de ATP proveniente dos neurônios osmossensíveis localizados nos órgãos circumventriculares (OCVs), mais especificamente no órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLt), o qual se conecta monossinápticamente com o PVN, e a partir deste, com conexões para o bulbo ventrolateral rostral (RVLM), de onde partem as eferências dos neurônios pré-simpáticos.

Métodos e Resultados: Para estudar esta possível via de transmissão purinérgica hipotalâmica-bulbar e a participação do ATP como neurotransmissor frente ao estímulo hiperosmótico com sobrecarga de sal, utilizamos o modelo animal experimental murino (*Wistar*) dividido em dois grupos: GRUPO SH-3M, que receberam uma infusão intravenosa de solução hiperosmótica de NaCl 3M e GRUPO ISO, que receberam uma infusão intravenosa de solução isosmótica de NaCl 0,154M. A análise neuroanatômica das conexões entre OCVs e o PVN foi feita por meio da injeção de um traçador neuronal retrógrado (Fluoro-Gold™ – FG) no PVN por meio da técnica de neurocirurgia estereotáxica. Nestes mesmos grupos, avaliamos a ativação neuronal com estímulo hiperosmótico por meio da expressão da proteína c-Fos combinado com a análise do

fenótipo neuronal purinérgico entre essas vias a partir da presença do transportador vesicular de nucleotídeo (VNUT), a partir da técnica de imunohistoquímica de fluorescência. Os neurônios ativados por estímulo hiperosmótico com sobrecarga de sal têm conexões entre OCVs – PVN, e o ATP, participa da neurotransmissão entre estes núcleos, que fazem parte da circuitaria do sistema nervoso autônomo simpático envolvido no controle neural da circulação.

Conclusão: Com os resultados obtidos, podemos concluir que existe uma circuitaria monossináptica purinérgica entre a via OCVs-PVN e que é recrutada em uma situação de desafio hiperosmótico por sobrecarga aguda de NaCl.

Apoio Financeiro: FAPESP #2023/04290-5

ADROPINA ALIVIA A NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA EM MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON POR MEIO DA VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/GSK3 β

Lemuchi, L.M. , Ferreira, A.F.F. , Britto, L.R.G., Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNc), acompanhada de manifestações motoras e não-motoras. Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos moleculares por trás desta neurodegeneração, a DP ainda não possui cura e os tratamentos atuais são limitados. A adropina é um peptídeo com potencial terapêutico para a DP, capaz de ativar a via de sinalização da PI3K/Akt, que impede vias apoptóticas por meio da inativação de GSK3 β . Portanto, o objetivo deste projeto foi averiguar se a adropina favorece a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos por meio deste mecanismo no modelo da doença de Parkinson induzido por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) em ratos.

Métodos e Resultados

Foram utilizados 48 ratos Wistar machos com três meses de idade (CEUA: 6567270123). A indução do modelo foi realizada por meio de injeção unilateral de 6-OHDA no estriado (CPU), alvo principal de projeções dopaminérgicas da SNc. Posteriormente, os animais foram tratados com uma dose de 2,1 ug/kg/dia de adropina intraperitoneal durante dez dias consecutivos. Após eutanásia, foram realizados ensaios de imuno-histoquímica com marcação para tirosina hidroxilase (n=3-4/grupo) e de *immunoblotting* (n=5/grupo) para as proteínas da via de interesse (PI3K, p-Akt, Akt, p-GSK-3 β e GSK-3 β). O modelo induzido foi validado ao se obter uma redução de 46% no número de células TH-positivas na SNc no grupo 6-OHDA+VEI em comparação ao grupo controle (p<0,001). Além disso, observamos que o grupo 6-OHDA+ADP apresentou um aumento de 41% nas células TH positivas em comparação ao grupo não tratado (p=0,026), bem como uma tendência de aumento da expressão de TH nesta região (p=0,058), indicando uma proteção contra a morte de neurônios dopaminérgicos. Os níveis de expressão de PI3K na SNc estão reduzidos no grupo 6-OHDA (p=0,027), acompanhados pela diminuição da relação pAkt/Akt e p-GSK-3 β /GSK-3 β nas regiões do estriado (p<0,05) e da substância negra (p<0,01). Dito isso, o tratamento com a adropina conseguiu restaurar esses níveis (p<0,05), ativando esta cascata de fosforilação defasada no modelo.

Conclusão

Nossos achados reforçam o envolvimento da desregulação da via PI3K/Akt/GSK3 β nos mecanismos patológicos envolvidos na Doença de Parkinson. Neste trabalho, mostramos que a adropina atua restaurando esta via nas regiões do estriado e da substância negra, exercendo neuroproteção ao prevenir a morte de neurônios dopaminérgicos e mantendo os níveis de tirosina hidroxilase na substância negra. Assim, sugerimos que a adropina possa ser um possível alvo terapêutico para a Doença de Parkinson.

Apoio financeiro: FAPESP, CAPES, CNPq

RELAÇÃO ENTRE O CONTROLE GENÉTICO DA FUNÇÃO TIREOIDIANA E O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

Yago Carvalho Lima¹, Iago-Junger Santos¹, Cibele E. Bandeira¹, Victor F. de Oliveira¹, Bruna S. da Silva², Maria Eduarda Tavares³, Diego L. Rovaris¹

1 Instituto de Ciências Biomédicas - USP, Departamento de Fisiologia e Biofísica

2 Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

3 Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Introdução: O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é um transtorno do neurodesenvolvimento caracterizado por desatenção e hiperatividade que podem levar a prejuízos na vida do indivíduo. Alguns trabalhos associam a disfunção tireoideana ao TDAH, embora ainda exista controvérsia em torno desta associação. **Objetivo:** Nesse contexto, o objetivo deste estudo é avaliar se o controle genético da função tireoideana está correlacionado com o controle genético envolvido no TDAH em um nível global e local. **Metodologias:** Este trabalho utilizou estatísticas sumárias de meta-análises de Estudos de Associação por Varredura Genômica (GWASs) mais recentes para o TDAH (N= 225.534) e hormônio estimulante da tireoide (TSH) (N= 247.107). As correlações genéticas globais e locais (r_g) foram estimadas a partir da análise de Linkage Disequilibrium Score Regression (LDSC) e Local Analysis of [co]-Variant Annotation (LAVA), respectivamente. **Resultados:** Os resultados do LDSC indicaram um r_g global, de valor negativo, significativo para TDAH e TSH ($r_g = -0,0723$, $P = 0,0087$) e a técnica de correlação local, que investigou de maneira mais aprofundada quais trechos do genoma (*locus*) carregam esta correlação, indicou de forma significativa que o locus 945, do cromossomo 6, está negativamente correlacionado com os fenótipos estudados ($r_g = -0,5620$, P corrigido por Bonferroni = 0,0360). Três genes foram localizados na região definida para o locus 945, o *SRY-Box Transcription Factor 4 (Sox4)*, *Cancer Susceptibility 15 (Casc15)* e o *Neuroblastoma Associated Transcript 1 (Nbat1)*. **Discussão:** Os genes localizados no locus 945 estão associados à progressão do câncer. Além disso, estudos apontam uma relação entre Sox4 e TSH. Assim como o TSH, o gene Sox4 tem um papel crítico durante a embriogênese, pois regula vários processos de diferenciação e desenvolvimento, incluindo o desenvolvimento neuronal. Dados da literatura indicam que em zebra-fish, Sox4b, homólogo de Sox4, desempenha um papel crucial na diferenciação de células tireotópicas, ou seja, células da hipófise anterior que sintetizam e secretam TSH; e a perda da função Sox4b leva a uma redução drástica na expressão de TSH- β , subunidade que confere especificidade hormonal. **Conclusão:** os resultados sugerem uma correlação genética pequena e inversamente proporcional entre os fenótipos estudados. O gene Sox4, localizado no locus 945, parece estar relacionado com TDAH e TSH, devido a associação encontrada entre os fenótipos. Anotação funcional ampliará a compreensão sobre esses achados.

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA INTESTINAL NO REMODELAMENTO DAS ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA NOS SHR

Dardi, P.¹; Gacek, RRF.¹; Rossoni, LV.¹

¹Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia e Biofísica, São Paulo, SP.

Introdução e objetivos: Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam remodelamento estrutural e mecânico das artérias mesentéricas de resistência (AMRs) antes do aumento da pressão arterial (PA) (fase pré-hipertensiva), acompanhado de alterações intestinais que estariam relacionadas à hipertensão (HA). Uma vez que estudos associam a patologia intestinal, na vida adulta, ao sistema renina angiotensina (SRA) local; e sugerem que o ambiente materno influencia o SRA renal no SHR, o objetivo deste trabalho foi avaliar como a troca do ambiente pós-natal (amamentação cruzada), e a inibição do SRA intestinal nesse período modulam o remodelamento das AMRs em SHR de 6 semanas de vida.

Métodos e resultados: Filhotes Wistar (W) e SHR (S) foram amamentados por suas mães, formando os grupos WW (n:24) e SS (n:23); ou por fêmeas da linhagem oposta, nos grupos WS (n:17) e SW (n:16). Adicionalmente, mães SHR foram tratadas com enalapril (10mg/kg/dia – v.o.) ou veículo durante a amamentação, e os filhotes formaram os grupos SSe (n:16) e SSv (n:20), respectivamente. A PA foi avaliada por pletismografia e o remodelamento das AMRs em miógrafo de pressão, analisando: a razão parede/lúmen (P/L) e a rigidez arterial (ângulo β). A quantificação de angiotensina II (Angio II) foi avaliada por ELISA em segmentos de intestino grosso. Análise estatística: ANOVA (p<0,05: [§]vs. WW; [@]vs. SS e [#]vs. SSv). Aprovação CEUA nº:1946260318. Os SHR apresentaram uma pequena elevação da PA em comparação aos Wistar (WW:117±0,97 vs. WS:116±0,86 vs. SS:127±0,99[§] vs. SW:127±1,34 mmHg). As AMRs dos SS tinham maior razão P/L e maior ângulo β (WW: 5,14±0,21 vs. WS: 4,99±0,16 vs. SS: 6,13±0,31[§] vs. SW: 5,36±0,27[@]) quando comparado aos WW e aos SW (sem mudanças entre os WS e os WW). A concentração de Angio II era maior no intestino dos SS e dos WS em comparação com os WW, mas era reduzida nos SW frente aos SS (WW: 0,90±0,04 vs. WS:1,67±0,15[§] vs. SS:1,83±0,23[§] vs. SW:1,01±0,11[@] pg/mL/ μ g). O tratamento com enalapril reduziu a razão P/L e o ângulo β (SSv: 12,9±1,14 vs. SSe:10±1,25[#]) das AMRs dos SSe frente aos SSv.

Conclusão: Concluímos que nas AMRs dos SS o remodelamento estrutural e mecânico está associado a ativação do SRA intestinal durante o período pós-natal; e que tanto a mudança do ambiente materno como a inibição do SRA reduzem a razão P/L e a rigidez vascular, melhorando o prognóstico da HA.

Apoio financeiro: CNPq, Capes e FAPESP (processo 2020/10381-5).

MELATONINA E A REGULAÇÃO DA FLUTUAÇÃO CIRCADIANA DA EXPRESSÃO DOS SEUS RECEPTORES (MTNR1A E MTNR1B) EM TECIDOS METABOLICAMENTE ATIVOS. Rego, L.S.M., Amaral, F.G., Cipolla-Neto, J. Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

Introdução e Objetivos. A melatonina (5-metoxi-N-acetilriptamina), um importante sinalizador temporal, é sintetizada centralmente por células especializadas da glândula pineal, influenciando processos reprodutivos, regulando e sincronizando ritmos cronobiológicos e atuando em várias funções celulares e metabólicas. Sua produção é regulada circadianamente pelo núcleo supraquiasmático e ocorre predominantemente durante o período noturno, independentemente do ritmo circadiano da espécie. Sua ação é mediada por dois tipos de receptores de membrana: MT1 e MT2, codificados respectivamente pelos genes MTNR1A e MTNR1B. Variantes genéticas desses genes têm sido associadas a elevações glicêmicas, aumento de colesterol e a certos tipos de câncer. Este estudo tem como hipótese principal a compreensão da regulação da expressão dos receptores de melatonina em tecidos metabolicamente ativos, em relação aos padrões circadianos. Para tanto, pretende-se avaliar a variação circadiana na expressão dos receptores melatoninérgicos, determinando se essa variação é influenciada pela concentração de melatonina e pela genética do indivíduo. **Métodos e Resultados.** Para alcançar esses objetivos, o projeto foi dividido em três etapas. A fim de se compreender a genética inerente à codificação dos receptores de melatonina no *Rattus norvegicus*, utilizou-se sequências de RNA mensageiro e de proteínas obtidas de bases de dados robustas para realizar alinhamentos múltiplos e construir árvores filogenéticas, visando uma compreensão mais aprofundada da relação filogenética entre espécies (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus*). Para o MTNR1A, *Homo sapiens* e *Pan troglodytes* possuem a maior identidade entre as sequências, enquanto a identidade entre *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus* foi de 78%. As maiores identidades entre as sequências de MTNR1B ocorrem entre *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus* e entre *Homo sapiens* e *Pan troglodytes*. Ao se comparar as sequências de nucleotídeos e aminoácidos do GPR50 com o MTNR1A em *Homo sapiens*, observa-se uma similaridade a nível de mRNA maior que em nível proteico, padrão que se mantém para *Rattus norvegicus* e na comparação entre GPR50 e o MTNR1B. **Conclusão.** Os resultados da árvore filogenética mostram uma diferenciação proeminente entre a sequência do GPR50 e dos receptores de melatonina, seguida por uma divergência posterior entre roedores e primatas para cada um dos receptores. Apesar do GPR50 ter perdido sua capacidade de se ligar à melatonina, ele ainda é um importante agente alostérico, especialmente em relação ao MT1.

Apoio financeiro: CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

INVESTIGATING THE CONNECTIONS BETWEEN C1 AND LIVER-PROJECTING DMV NEURONS INVOLVED IN THE AUTONOMIC CONTROL OF GLUCOSE HOMEOSTASIS

Romeu, D. P., Silva, L. U., Antunes, V. R.

Department of Physiology and Biophysics – Institute of Biomedical Sciences - USP

Introduction and objectives: glucose is the main energy substrate used by most of the body's cells, particularly by the brain, and its plasma level is finely regulated through a complex interaction of hormonal and neuronal autonomic signals, from and to organs. Parasympathetic fibers innervating the liver originate from preganglionic neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV), which receives monosynaptic glutamatergic neurotransmission from the C1 neurons in the ventrolateral medulla, being reasonable to suppose that this connection from C1 to DMV may comprise a neuronal circuitry as part of the glycemic control. We sought to assess whether there is apposition of the terminals of C1 neurons with the hepatic efferents, and which glycemic challenge may activate this circuitry. **Methods and results:** the experimental procedures were approved by the Ethics Committee of Animals Welfare of the ICB-USP (#9141070319). Male Wistar rats at eight weeks of age received an anterograde lentiviral vector PRSx8-ChR2-eYFP, delivered stereotaxically into the C1 region. After 30 days, the animals received injections of the retrograde tracer FluoroGold (FG) in the liver. After seven more days, these rats were deeply anesthetized and transcardially perfused to collect the brains. To assess which glycemic challenge could activate the C1-DMV pathway, we tested three stimuli: hypoglycemia (insulin; 1UI/kg, i.p), glucose overload (3.6g/kg; i.p.), and glucoprivation (2-deoxy-d-glucose; 400mg/kg), all by intraperitoneal injections, seven days after injections of FG in the liver. A control group received an intraperitoneal injection of 0,9% NaCl. After 90 min, rats were deeply anesthetized and transcardially perfused to fixate for immunoreaction to detect the Fos protein, as a marker for neuronal activation. We observed varicosities and fibers originating from the C1 neurons with apposition with the DMV-FG+ neurons. Glucose overload and glucoprivation led to an expressive Fos+ staining in the dorsal-vagal complex, including the DMV, and some of these DMV-Fos+ neurons were also liver-projecting, as confirmed by FG staining. Detection of Fos+ neurons also in the C1 region and the C1/A1 region overlap, when compared to insulin-induced hypoglycemia and control groups. **Conclusion:** the results lead us to suggest that hyperglycemia (here induced with glucose overload), as well as glucoprivation, may be potential stimuli that recruit C1-DMV connection, activating the parasympathetic efferent pathway to the liver.

Financial support: FAPESP 2019/06482-3; 2022/02895-4. CAPES 88887.640742/2021-00. CNPq 132132/2019-2

DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA

ROLE OF ATPASE INHIBITORY FACTOR 1 (IF1) IN CD4⁺ T CELLS IN EXPERIMENTAL MALARIA

SOUZA, D. C. S. R., RAEDER, P. H. L., CANTARINI, D. G., CODOGNATO, S. G., PEREZ, C. E. M., MUXEL, S. M., ALVAREZ, J. M., LIMA, M. R. D., Immunology Department, Institute of Biomedical Sciences-USP.

Introduction and Objectives

The upregulation of the glycolytic pathway ensures optimal proliferation, differentiation and effector function of CD4⁺ T cells, which is essential for their response during the infection with *Plasmodium* parasites. In cancer cells, this metabolic change can be promoted by the ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1), an endogenous inhibitor of ATP synthase; it is unclear, however, whether IF1 has a similar role in CD4⁺ T cells. This work aims to evaluate the role of IF1 in CD4⁺ T cells in experimental malaria.

Methods and Results

Splenic TCR-specific CD4⁺ T cells were transferred to C57BL/6 wild-type (WT) and CD4 knockout (*Cd4*^{-/-}) mice during the acute phase of *P. chabaudi* infection. Analysis of single-cell RNAseq public data revealed increased IF1 gene expression in activated cells in comparison with naive cells; these results were confirmed by RT-qPCR at day 7 post infection. CD39⁺ cells showed a T_H1 phenotype with high expression of T-bet, CXCR6 and CD122, while CD73⁺ cells showed a T_{FH} phenotype with high expression of Bcl-6, CXCR5, FR4 and P2X7. Disrupting IF1 gene expression in TCR-specific CD4⁺ T cells transferred to WT mice did not affect the generation of CD39⁺ and CD73⁺ cells; moreover, no differences were found on mitochondrial polarization, IFN- γ production and phosphorylation of metabolic sensors mTOR and Akt, suggesting that the effects of IF1 on CD4⁺ T cells may be more prevalent at earlier time points of infection. Surprisingly, at day 9 post infection, IF1-deficient TCR-specific CD4⁺ T cells transferred to *Cd4*^{-/-} mice showed increased expression of T-bet, production of IFN- γ and phosphorylation of Akt while decreased expression of PD-1, indicating that, in the absence of IF1, the response may be delayed, remaining substantial at a time when the response observed in the presence of IF1 arguably moved into the contraction phase.

Conclusions

The expression of CD39 and CD73 by TCR-specific CD4⁺ T cells can be used to identify T_H1 and T_{FH} cells, respectively, during the acute phase of *P. chabaudi* infection. It is possible that the role of IF1 in CD4⁺ T cells is more prevalent in the early stages of infection, leading to a delay in the response of these cells.

Financial Support

This work is supported by FAPESP (2022/14529-2; 2015/20432-8), CAPES (88887.820673/2023-00) and CNPq (303810/2018-1).

INFECTION-INDUCED DISRUPTION OF THE CHOLINERGIC PATHWAY IMPACTS MESENTERIC IMMUNE TONE AND SUSTAINS IMMUNOLOGICAL SCARRING IN THE GUT

Conceição, L.B., Gonçalves, L.M., Silva, L.M., Moreira, F., Pizzolante, B.C., Silva, G.W., Araújo, M.V., Kanashiro, A., Prado, C.M., Donato, J., Alves-Filho, J.C., Castelucci, P., Oliveira, E.E., Fonseca, D.M., Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction and Aims

The gastrointestinal tract (GI) is considered the largest lymphoid tissue in the body, as it contains more leukocytes than all the lymphoid organs combined. In addition, the GI mucosa is highly exposed to environmental antigens, therefore requiring a complex network of regulatory mechanisms to sustain tissue homeostasis. We have shown that a single episode of GI infection by *Yersinia pseudotuberculosis* (YP) in mice disrupts mesenteric lymphatics function, impairing dendritic cell migration and the induction of gut canonical regulatory responses. This process, which we have named immunological scarring, causes irreversible inflammation in the mesentery, compromising regulatory and type 2 immunity and increases susceptibility to inflammatory diseases.

In this work, we studied the contribution of the cholinergic and Interleukin-33 (IL-33) pathways to the mechanisms sustaining immunological scarring.

Methods and results

The model of YP infection in mice was used to characterize its impact on IL-33 and Acetylcholine (ACh) production and, subsequently, its impact in regulatory T cells (Treg) phenotype and function. We found that the IL-33-dependent type 2 mesenteric immune tone was negatively regulated by ACh, as the blockage of ACh signaling increased the infiltration of type 2 cells (such as eosinophils, Th2, and ILC2) in the mesentery in an IL-33-dependent manner. Notably, YP infection promoted ACh production by leukocytes present in mesenteric fatty-associated lymphoid clusters (FALCs) and reduced the local type 2 immune tone. Thus, the suppression of mesenteric type 2 immunity by YP was mediated by ACh. Recent studies highlight the importance of IL-33 signaling in promoting Foxp3 expression in Treg which is essential for maintaining the suppressive function of these cells. Therefore, we hypothesize that the impairment of regulatory responses during YP-induced immunological scarring is dependent on the ACh-IL-33 axis.

Conclusion

In conclusion, our study demonstrates that a single episode of *Yersinia pseudotuberculosis* infection in mice leads to immunological scarring in the mesentery, impairing regulatory and type 2 immunity. This process is mediated by the cholinergic pathway, where ACh suppresses IL-33-dependent type 2 immune responses. Further studies are ongoing to evaluate the role of this mechanism in the loss of suppressive capacity of Treg lymphocytes and ultimately its impact on the development of inflammatory bowel disease (IBD) and oral tolerance mechanisms.

Funding

Funding agencies: FAPESP and CNPQ

HIF-1 α INTERACTION WITH HIF-1A ANTISENSE LONG NON-CODING RNA REGULATES GLUCOSE METABOLISM RELATED GENES IN MACROPHAGES DURING *Leishmania infantum* INFECTION AND TLR STIMULATION

Zanatta, J.M., Teixeira, C.A., Eleutério, B.P., Oliveira, V., Muxel, S.M., Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da USP

Introduction and objectives: Transcriptional and post transcriptional regulation of gene expression are related to long noncoding RNAs (lncRNAs), a class of non-protein-coding RNAs long than 200 nucleotides encoded in the intergenic, intronic and antisense genomic region. Recently, lncRNAs are implicated in regulation of metabolic reprogramming of glycolysis in cancer cells. The activation of Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) contributes to the Warburg effect through a switch from oxidative phosphorylation to glycolysis. The interaction between the complex of HIF-1 α and the lncRNA HIF1A-AS3 can lead to increased transcriptional levels of genes related to glycolysis, such as glucose transporter 1 (GLUT1), hexokinase II (HKII) and lactate dehydrogenase (LDHA). Here, we aim to evaluate the interaction of the transcription factor HIF-1 α and the long noncoding RNA HIF1A-AS3 and their function in glycolytic metabolism in macrophages infected with *Leishmania infantum*. We hypothesized that infection with *L. infantum* alters oxygen availability and induces the expression of HIF-1 α and the lncRNA HIF1A-AS3, encoded in the antisense strand of HIF1A. The interaction between HIF-1 α and HIF1A-AS3 and between them and HIF-1 α target genes alters the activation and immunometabolism of macrophages, increasing susceptibility to *Leishmania* infection.

Methods and results: Our results we observed a reduction in the expression of HIF1A and lncRNA HIF1A-AS2 transcripts, while increasing the expression of GLUT1 in THP-1 macrophages infected with *L. infantum*. Interestingly, stimulation with LPS increased the expression of HIF1A and the lncRNA HIF1A-AS3, while stimulation via TLR3 and TLR7 did not alter them. We analyzed the infection with *L. infantum* in murine model, BALB/c and C57BL/6 mice. We showed an increase in the expression of lncRNA *Gm15283*, the murine ortholog of lncRNA HIF1A-AS3, and also the *Hk2*, *Pdk1* and *Tnfa* transcripts and in spleen and liver of C57BL/6 mice after 3 weeks of infection. In BALB/c mice, we observed a reduction in expression of *Il1b*, *Il-6* and *Ccl2*, but did not alter *Hif1a* and lncRNA *Gm15283*. The LPS stimulation of C57BL/6 mice increased the expression of *Hif1a*, *Gm15283* and genes related to the glycolytic pathway, in liver samples and mainly in CD11b⁺ cells from spleen. Our findings indicate a correlation between the expression of HIF1A and HIFA-AS3 and from this we will begin analyzes of lncRNA function using CRISPR-Cas9 tools for knocking down and overexpressing HIF1A-AS3.

Financial support: FAPESP, CAPES and CNPq.

ROLE OF CD39 EXPRESSION BY FOLLICULAR REGULATORY T CELLS ON ANTIBODY PRODUCTION DURING EXPERIMENTAL MALARIA

Raeder P.H.L., Cantarini D.G., Chaves D., Graton S.C., Almeida G., Coutinho R., Álvarez J.M., Salles E.M., Lima M.R.D.

Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introdução e Objetivos:

Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium sp* parasites. During *Plasmodium* infection, the germinal center reaction is essential for producing high-affinity antibodies that aid in controlling the parasitemia. In the germinal center, while follicular helper CD4⁺ T cells (Tfh) stimulate, follicular regulatory CD4⁺ T cells (Tfr) usually suppress antibody production. Both follicular CD4⁺ T cell populations express high levels of the P2X7 receptor, which is activated by extracellular ATP (eATP). However, only Tfr cells express high levels of the ectonucleotidase CD39, which hydrolyzes eATP to generate adenosine. High concentrations of eATP can lead to Tfh cell death through P2X7 activation, on the other hand, adenosine suppresses Tfh cell and B cell function. Therefore, our objective was to evaluate the role of CD39 expression by Tfr cells on Tfh cell and B cell populations during *Plasmodium chabaudi* infection.

Métodos e Resultados:

For this, we transferred Tfh cells alone or along with WT or *Entpd1*^{-/-} Tfr cells into C57BL/6 *Cd28*^{-/-} mice infected with *P. chabaudi*. On day 52 p.i., we analyzed splenocytes using flow cytometry. We then observed that both WT and *Entpd1*^{-/-} Tfr cells equally suppressed the size of the B cell populations in proliferation (Ki67^{hi}), but did not interfere with the size of the germinal center B cell population compared to mice that received only Tfh cells. However, we observed that Tfh + *Entpd1*^{-/-} Tfr cell recipient mice displayed a smaller population of Tfh cells than Tfh + WT Tfr cells recipient mice or Tfh cell recipient mice.

Conclusões:

These results suggest that CD39 expression on Tfr cells promotes the maintenance of Tfh cell population, possibly by controlling eATP levels and, hence, preventing Tfh cell death, but does not appear to contribute primarily to the suppressive function of Tfr cells.

Apoio Financeiro:

FAPESP (2024/05893-8; 2015/20432-8), CNPq (303810/2018-1) and CAPES

CISPLATIN-INDUCED PODOCYTE INJURY AND ACUTE KIDNEY DISEASE: MECHANISTIC INSIGHTS

Ramos, B.L.¹, Paolinetti, A.R.S.², Neto, O.F.¹, Camara, N.O.S.¹, Alves-Silva, T.¹

1. *Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, USP*
2. *Division of Nephrology, Paulista School of Medicine, UNIFESP*

Introduction and Objectives

Podocytes are renal cells that play a crucial role in the selective filtration of molecules in the nephron. These cells are susceptible to several stressors that can alter and compromise podocyte function. Cisplatin is a chemotherapeutic agent known for its nephrotoxicity, primarily affecting Proximal Tubular Epithelial Cells (PTECs). However, its direct effects on podocytes are poorly understood. This study aims to explore the impact of cisplatin on podocytes to elucidate the pathogenesis of cisplatin-induced acute kidney injury (AKI) and facilitate the development of new therapeutic strategies. The objectives include: assessing morphological changes and podocyte viability, evaluating gene expression of injury markers and cytoskeletal genes, exploring the impact on cellular metabolism, interactions between podocytes and PTECs, and glomerular injury markers in an AKI model.

Methods and Results

A conditionally immortalized mouse podocyte cell line was exposed to cisplatin for 24 hours. The MTT assay revealed no significant changes in cell viability, but optical microscopy showed cytoskeletal retraction and loss of branched morphology. Lactate concentration did not change in the supernatants of podocytes treated with 6 µg/ml or 12 µg/ml of cisplatin compared to the control (saline). In C57BL/6 mice treated with a single intraperitoneal injection of cisplatin (20 mg/kg) for 96 hours, there was an increase in serum urea and creatinine levels. Cisplatin also increased the expression of genes related to podocyte injury and decreased genes related to peroxisomal metabolism in the kidney, results assessed by qPCR. To test if cisplatin affects podocytes, data were analyzed by using Student's t-test or one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$) after data normality distribution evaluation by the Kolmogorov-Smirnov test.

Conclusions

Cisplatin potentially causes direct alterations in podocytes, suggesting a crucial role for these cells in the pathogenesis of AKI. These findings complement the existing knowledge on cisplatin nephrotoxicity, traditionally associated with tubular injury, which may contribute to new therapeutic strategies.

Financial Support: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and São Paulo Research Foundation (FAPESP).

EXPRESSÃO DOS LONG NONCODING RNAs (NKILA E PACER) EM MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L. INFANTUM*.

Lima, C.N.C., Zanatta, J. M., Eleuterio, B. P., Muxel, S. M., Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

Introdução e Objetivo: A leishmaniose é um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, as manifestações clínicas da leishmaniose variam de acordo com espécie, e gravidade da doença. A infecção com *Leishmania* altera a expressão de long noncoding RNAs (lncRNAs) e também a ativação de NF-κB e consequentemente a ativação da resposta pró-inflamatória dos macrófagos em resposta ao parasita. A interação entre lncRNAs NKILA e a proteína IκBα regula negativamente o NF-κB, enquanto PACER interage com o dímero de NF-κB p50/p50 e regula positivamente a indução da expressão gênica de citocinas e produção de óxido nítrico, que pode levar a susceptibilidade à infecção. O objetivo foi investigar a expressão dos lncRNAs o NKILA e PACER em tempos diferentes.

Métodos e Resultados: Utilizamos 2 primers inicialmente para cada gene com amplificação em regiões distintas do lncRNA maduro a partir do cDNA de amostras de macrófagos THP-1 infectados com *L. infantum* ou estimulados com LPS (100 ng/mL) por 4 e 24h. Em nosso primeiro experimento, observamos que a infecção dos macrófagos não altera os níveis de NKILA nas 4h, tanto utilizando o primer 1 ou 2. Curiosamente, nas 24h de infecção os níveis de NKILA reduziram quando utilizamos o primer 1, comparado ao macrófago não infectado. O estímulo com LPS não alterou os níveis de NKILA nos tempos e amostras analisadas. Como esperado, observamos a redução nos níveis de PACER (primer 1 e 2) em infectados com *L. infantum* nas 4h, mas apresentou uma tendência de aumento nas 24h de infecção. O estímulo com LPS aumentou os níveis de PACER nas 4 e 24h de estímulo. O aumento no número de amostras poderá indicar de modo mais preciso a expressão destas moléculas durante a infecção e estímulo com LPS.

Conclusão: Nossos dados iniciais sugerem que a infecção com *L. infantum* regula a expressão de NKILA e PACER de maneira distinta ao estímulo com LPS em macrófagos THP-1. A compreensão da modulação da ativação dos macrófagos mediada por NKILA-IκBα e PACER p50/p50, sua influência na regulação transcricional de genes relacionados à resistência a infecção é de extrema relevância para entender como fatores do parasita e do hospedeiro contribuem para a patogênese da leishmaniose.

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

EFEITOS DO USO DE AZITROMICINA NO DESENVOLVIMENTO DE ASMA ALÉRGICA. ABREU, A.M.; OLIVEIRA, E.E.; FONSECA, D.M. Laboratório de imunologia de mucosas, Departamento de Imunologia - Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: A prevalência de asma tem aumentado nos últimos anos, e o uso indiscriminado de antibióticos tem sido apontado como um fator de risco crítico. Nesse sentido, estudos indicam que um quadro disbiótico contribui para o desenvolvimento e agravamento da asma alérgica, com modificação do perfil inflamatório envolvido. Nesse contexto, o aumento do uso de azitromicina, ao longo da pandemia de COVID-19, pode contribuir para o agravamento deste cenário. Resultados prévios indicam que o uso da azitromicina em modelo de asma desencadeia resultados distintos em indivíduos em condições diversas, agravando parâmetros importantes em animais eutróficos, ao passo que atenua fatores importantes da asma agravada pela obesidade. No entanto, ainda não há relatos do efeito do tratamento precoce com azitromicina no desenvolvimento da asma alérgica. Portanto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da exposição à azitromicina anterior aos desafios (fase efetora da alergia pulmonar), para avaliar o impacto no desenvolvimento da doença, e durante esse período, como um tratamento para a mesma, em modelo murino de asma. **Métodos e Resultados:** Para cumprir com os objetivos propostos, utilizamos um modelo de indução de asma alérgica experimental murino, baseado na exposição ao alérgeno Ovalbumina e como adjuvante Papaína por via intranasal, sendo realizadas três sensibilizações com ambos os compostos seguida de dois desafios apenas com o alérgeno. O tratamento com azitromicina foi feito na fase de sensibilização, e durante a etapa dos desafios, ambos os oito dias. A Azitromicina não afeta a composição da população de leucócitos no lavado broncoalveolar, contudo interfere no perfil do infiltrado inflamatório durante o desenvolvimento da alergia pulmonar experimental. Inibindo perfis Th2 e Th17 durante indução de alergia pulmonar experimental, e aumentando a frequência de Tregs no pulmão homeostático. Além de resultar em diminuição da frequência de células mielóides em animais alérgicos, como os eosinófilos e monócitos. **Conclusões:** Portanto, os resultados obtidos neste projeto permitiram gerar mais questionamentos acerca da relação entre o uso indiscriminado de antibióticos, sendo neste projeto o protagonista o macrolídeo azitromicina usada no contexto de asma experimental, relacionando à resposta imunológica, sendo ainda necessários outros experimentos que comprovem o fenótipo obtido, que difere da hipótese inicial de aumento dos níveis de desenvolvimento do quadro alérgico.

Apoio Financeiro: PIBIC/CNPq

BLOCKING HIF2A IMPROVES THE HOST'S RESISTANCE TO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* INFECTION

Oliveira J^{1,2}, Montuori-Andrade A. C^{1,2}, Silva G. C³, Denadai M. B^{3,4}, Matteucci K. C^{3,4,5}, Bonato V L. D^{3,4}, Costa D. L^{1,2,4}.

1. Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Brazil. 2. Graduate Program in Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Brazil. 3. Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Brazil. 4. Graduate Program in Basic and Applied Immunology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Brazil. 5. Fiocruz Bi-Institutional Translational Medicine Platform, Ribeirao Preto, Brazil

Introduction and Objectives: Tuberculosis (TB) is caused by the infection with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) bacillus. TB currently remains in the top 10 causes of death from infectious diseases worldwide due to its virulence. Mtb mainly resides in macrophages, manipulating metabolic changes to avoid destruction, which boosts its replication. New methods to help control TB have been proposed, focusing on strategies targeting the host's biological processes involved in the disease. Hypoxia-inducible factor (HIF) control metabolism and activation of leukocytes. HIF1 α is essential for host defense during TB by mediating M1 macrophage polarization. HIF2 α induces M2 macrophage polarization, but its role in TB remains unknown. We aim to study the impact of HIF2 α signaling in myeloid cells on host resistance to TB. **Methods and Results:** we initially infected C57BL/6 mice with Mtb and found that HIF2 α expression in the lungs was detected mainly in alveolar macrophages by flow cytometry. On the other hand, infected mice presented lower HIF2 α mRNA expression compared to naïve animals at 4 weeks post infection (wpi). The treatment of Mtb-infected C57BL/6 mice with HIF2 α inhibitor (PT-2385) led to a decrease in lung bacterial levels. Animals with conditional deletion of HIF2 α in myeloid leukocytes displayed reduced pulmonary bacterial levels compared to wild-type (WT) counterparts at 4 wpi. There were no major differences in pulmonary inflammatory infiltrates between the groups, however, we found higher HIF1 α expression in lungs of HIF2 α conditional KO mice compared to WT animals. In vitro, we found that Mtb infection leads to decreased HIF2 α gene and protein expression in bone marrow-derived macrophages (BMDM) and that HIF2 α inhibition or gene deletion results in enhanced resistance to infection. Furthermore, HIF1 α gene and protein expression levels were higher in HIF2 α KO compared to WT Mtb-infected BMDM. **Conclusions:** Our findings show that deleting HIF2 α from myeloid leukocytes improves resistance to Mtb infection, suggesting that HIF2 α may counteract the effects of HIF1 α expression in macrophages.

Financial support: FAPESP, CAPES

***Mycobacterium tuberculosis* infection increases the expression of iron transporters in activated and Th1 lymphocytes.**

Montuori-de-Andrade, A.C.M.¹; Correa, A.A.S²; De Oliveira, J. ¹; Denadai, M.B²; Maia, L.H¹; Gomes, T.F¹; Costa, D.L^{1,2}.

1. Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo ICB-USP.
2. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto FMUSP-RP.

Tuberculosis (TB) is one of the diseases caused by a single infectious agent that kills most people in the world. A better understanding of the host response mechanisms that promote protection against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) infection may help in the development of more effective strategies to cure TB, since there is no effective vaccine for its prevention in adults and its treatment is lengthy with several side effects. Iron plays an important role in both pathogen and host metabolism. T cells play a critical role in host resistance against Mtb infection, however, the role played by iron metabolism in the modulation of T cell function in TB is unknown. In order to investigate this, we initially assess the influence of iron in Th1 differentiation *in vitro* isolating naïve TCD4 lymphocytes of C57BL/6 spleen and culturing in presence of iron donors or iron chelators with specific stimuli to Th1 differentiation. We saw that iron chelation decreased Th1 differentiation and iron supplementation stimulates INF- γ ⁺Tbet⁺CD4⁺ and decrease TNF⁺Tbet⁺CD4⁺ differentiation *in vitro*. Then, we isolated naïve TCD4 of Fptn^{+/+} CD4 Cre⁺ or DMT1^{+/+} CD4 Cre⁺ mice in order to evaluate differentiation of Th1 *in vitro* in comparison to control. We saw an increase in INF- γ ⁺Tbet⁺CD4⁺ differentiation of Fptn^{+/+} CD4 Cre⁺ and a decrease in INF- γ ⁺Tbet⁺CD4⁺ and TNF⁺Tbet⁺CD4⁺ differentiation of DMT1^{+/+} CD4 Cre⁺ in comparison to WT *in vitro*. Next, we infected C57BL/6 mice with H37Rv strain Mtb and evaluated the expression of CD71, DMT1 and ferroportin in pulmonary CD4⁺ T lymphocytes by flow cytometry. We found that the expression of CD71 and ferroportin was increased in CD4⁺ T cells in response to Mtb infection, particularly in CD44⁺ and in Tbet⁺ CD4⁺ T lymphocytes at 4 weeks post-infection, indicating that they are upregulated in Th1 activated lymphocytes. It was not possible identify DMT1 labeling, so this experiment must be repeated. In other to investigate the role of iron supplementation in Mtb susceptibility *in vivo*, we treated H37Rv strain Mtb infected C57BL/6 mice with iron dextran 1g/kg/week for 4 weeks and the results showed that treated mice were more susceptible to Mtb infection. To investigate the role of ferroportin in T cells during TB, we infected mice deficient for ferroportin in T cells and assessed their susceptibility to infection in comparison to wild type mice. Our preliminary results indicated that ferroportin deficiency in T cells does not interfere in host resistance to TB. Altogether, our results suggest that iron homeostasis in CD4⁺ T cells might be impacted by changes in iron transporter expression during Mtb infection, which may play a role in T cell function. However, there seems to be no role for ferroportin in the modulation of T cell responses and /or resistance to TB. Financial support: FAPESP

EFEITOS DO TRATAMENTO *IN VITRO* COM A SITAGLIPTINA NA POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS

Quadros-Pereira, L.^{1,2}, Nery-Neto, J.A.O.^{1,2}, Da Silva, E.M.^{2,3}, Doretto-Silva, L.², Yariwake, V.Y.^{1,2}, Câmara, N.O.S.¹, Andrade-Oliveira, V.^{1,2}

¹ Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP;

² Centro de Ciências Naturais e Humanas-UFABC;

³ Escola Paulista de Medicina-UNIFESP.

Introdução e Objetivos: Os macrófagos (M \emptyset) participam da indução e controle da resposta imune e da homeostase do hospedeiro. A sitagliptina é um fármaco que inibe a enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4) e, portanto, aumenta a biodisponibilidade das incretinas GIP (*Gastric inhibitory polypeptide*) e GLP-1 (*Glucagon-like polypeptide*). A sitagliptina tem sido utilizada para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2 e obesidade e recentemente tem sido associada a efeitos anti-inflamatórios. Sabe-se que o fármaco possui a capacidade de modular a resposta imune, todavia, os mecanismos pelos quais exerce seus efeitos anti-inflamatórios ainda não estão completamente elucidados, incluindo a influência e ação na ativação e função de M \emptyset . Dessa forma, nosso objetivo é investigar e caracterizar os efeitos do tratamento *in vitro* com a sitagliptina na polarização de M \emptyset . **Métodos e Resultados:** Os M \emptyset foram diferenciados *in vitro* a partir de células derivadas da medula óssea de murinos na presença do meio condicionado da linhagem celular L929 (LCM) por 6 dias. Para a polarização em M1, foram estimulados com IFN- γ e LPS, e para M2, com IL-4 e IL-13. O tratamento com a sitagliptina foi realizado durante as 24 horas de polarização. Avaliamos marcadores de polarização, DPP-4, os receptores de GIP e GLP-1, e a dinâmica mitocondrial por citometria de fluxo e expressão gênica, e investigamos a fagocitose por citometria de fluxo. O tratamento com a sitagliptina exacerbou o fenótipo M2, com aumento da expressão de CD206 e Arg1 e diminuição de TNF- α . O aumento de M2 no tratamento com sitagliptina está associado a diminuição do potencial de membrana e na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondrial, além de diminuição da expressão gênica de genes associado a mitofusão, sugerindo que a sitagliptina potencializa o fenótipo M2 através de alterações na dinâmica mitocondrial. Por fim, o tratamento com sitagliptina nos macrófagos M2 diminuiu a fagocitose dos macrófagos M2. **Conclusão:** A sitagliptina possui efeitos anti-inflamatórios nos M \emptyset *in vitro* durante a polarização apenas no perfil M2, exacerbando o fenótipo. Esses efeitos observados auxiliam no nosso entendimento do potencial farmacêutico da sitagliptina e seu papel na polarização de M \emptyset . **Apoio financeiro:** FAPESP nº 2021/10908-6; nº 2019/14755-0.

STUDY OF T CELL-MEDIATED IMMUNITY IN EXPERIMENTAL COVID-19: INVOLVEMENT OF PURINERGIC SIGNALING

MARCOS VINÍCIOS PINHEIRO CIONE⁰, IGOR SANTIAGO CARVALHO², LUCIANA DOS SANTOS BARROS MANHÃES¹, RODRIGO JOSÉ ROCHA XAVIER FREITAS¹. DEBORAH GIOVANNA CANTARINI¹, MARCELO MENEGATTI DE MELO¹, ROGÉRIO SILVA DO NASCIMENTO¹, VIVIANE FONGARO BOTOSSO³, ANA MARCIA DE SÁ GUIMARÃES⁴, DENISE MORAIS DA FONSECA¹, JOSÉ MARIA ÁLVAREZ¹, MARIA REGINA D'IMPÉRIO LIMA¹.

¹Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

²Department of Immunology, Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona, USA.

³Laboratory of Virology, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

⁴Departament of microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Introduction & AIM: Immunization plays a crucial role in preventing viral infections. However, vaccine efficacy can vary depending on factors such as the pathogen's nature, vaccine type, and individual immune response. To improve immunization strategies, understanding and manipulating underlying immunological mechanisms that enhance vaccine responses are essential. This study investigated optimal immunization conditions to optimize the generation and maintenance of tissue-specific resident memory T cells (TRMs) specific to SARS-CoV-2 in the lung. **Methods and results:** C57BL/6 mice were immunized with inactivated SARS-CoV-2 via intravenous and intranasal routes (IV+IN) or intranasal only (IN). IV+IN immunization involved an IV dose on day 0 and three IN doses on days 7, 10, and 13. On day 46, lung tissues were analyzed. To explore eATP interaction during immunization, the same strategy was repeated with the addition of 4.5 mM BzATP to intranasal doses. Fluorescent anti-CD45 intravenous antibodies and anti-ARTC2 nanoantibodies were used to differentiate cells in the lung parenchyma and vasculature, preventing NAD- and ATP-induced cell death. CD4+ and CD8+ T cell responses in the lung parenchyma were evaluated by flow cytometry. IV+IN immunization induced a robust population of activated lung cells expressing high levels of the extracellular receptor P2RX7, crucial for TRM generation and maintenance. However, adding eATP to inactivated SARS-CoV-2 immunization resulted in a reduced response, possibly due to high ATP doses. **Conclusion:** Understanding immune responses to infection-induced damage allows more effective manipulation of TRM generation and maintenance, contributing to tissue-specific memory development. This study provides valuable insights for optimizing vaccine strategies against viral infections.

Keywords: SARS-CoV-2. Immunization. COVID-19. Protection. Purinergic signaling.

TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS HUMANOS (moDC) COM mRNA TOTAL DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS: AVALIAÇÃO DA ESTRATÉGIA EM MODELO COM CÉLULAS DE LINHAGEM TUMORAL DE GLIOBLASTOMA E moDC DE DOADORES SAUDÁVEIS

Savério, L.; Francisco, T.; Vaz, J.; Muxel, S.; Barbuto, J.

Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas- USP

Introdução: O glioblastoma (GBM) é o tipo mais agressivo e frequente de tumor do sistema nervoso central e o tratamento padrão para esta doença ainda deixa muito a desejar. Uma abordagem que tem gerado resultados promissores é a imunoterapia, a qual, em nosso laboratório, tem sido estudada sob a forma de vacinação terapêutica usando células dendríticas derivadas de monócitos (moDC) de doadores saudáveis, fundidas com células tumorais autólogas dos pacientes. Porém, quantidades significantes de tumor necessárias para a produção desta vacina, dificultando a continuidade do tratamento por longos períodos, além da necessidade de procedimento invasivo para sua confecção.

Metodologia: Uma estratégia para substituir as células tumorais com fonte de antígenos para apresentação pelas moDC seria o uso do mRNA total das células tumorais, amplificado in vitro e transfectado para as moDC. Assim, neste projeto, avaliamos a transfecção de mRNA, obtido da linhagem de glioblastoma U-87 MG, para moDC. Para isso, 5µg de mRNA total foram utilizadas em diferentes tempos de transfecção (6,12 e 24 horas), por 2 métodos de transfecção (transfecção passiva e lipofecção) em dois tipos de condição de maturação da moDC (imatura e madura); a eficiência da transfecção foi avaliada pela expressão da proteína GFAP; e o fenótipo da moDC transfectada foi determinado por citometria de fluxo, avaliando-se a expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos (HLA-DR e HLA-ABC), moléculas envolvidas em co-estímulo (CD80 e CD83) e molécula envolvida na regulação da resposta imunológica (CD274 - PD-L1).

Conclusão: A maior frequência de expressão de GFAP pelas iDC foi observada após 6 horas da lipofecção com mRNA tumoral, enquanto para as mDC, esta maior frequência foi observada no mesmo tempo, mas após transfecção passiva. Em tempos subsequentes essa expressão de GFAP foi perdida, em todas as condições, o que, supomos, poderia ser explicado pela atividade de processamento de antígenos que a célula desempenha. Também nesses tempos, as moDC transfectadas com mRNA total da linhagem de glioblastoma, independentemente do método de transfecção, mostraram diminuição da expressão de PD-L1, em comparação com os controles, sendo mais nítida a diminuição no grupo iDC. Diferentemente, a lipofecção do mRNA total em iDC manteve a intensidade de expressão e frequência de células CD83+. Esses resultados indicam que, moDC podem traduzir proteínas não constitutivas dela, através da entrega do mRNA; ao mesmo tempo em que a análise do fenótipo das moDC transfectadas sugere que estas células conservam, após a entrega do mRNA, a capacidade de estimular respostas de linfócitos.

Apoio financeiro: ICB-USP, CNPq e CAPES

O PAPEL DA CD39 NA RESPOSTA IMUNE DURANTE A SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO ASSOCIADA À MALÁRIA

MANHÃES L.S.B.¹, CIONE M.V.P.¹, FREITAS R.J.R.X.¹, CANTARINI D. G.¹, NASCIMENTO R.S.¹, CLASER C.³, MARINHO C.R.F.², SANTOS Y.S.⁴, EPIPHANIO S.⁴, COUTINHO-SILVA R.⁵, ROBSON S.C.⁶, ÁLVAREZ J.M.¹, LIMA M.R.D.¹.

¹Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil. ²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil. ³Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil. ⁴Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil. ⁵Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. ⁶Harvard Medical School, Massachusetts, Boston, Estados Unidos da América.

Introdução e Objetivos: A síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária (SDRA-MA) resulta em danos significativos aos tecidos, o que pode aumentar os níveis de ATP extracelular (eATP). O eATP ativa os receptores purinérgicos P2 em células imunológicas, causando inflamação, ou é hidrolisado pelas ectonucleotidasas CD39 e CD73 em adenosina, que modula a resposta imunológica para um estado anti-inflamatório. Neste estudo, investigamos o papel do CD39 na SDRA-MA durante a infecção com *Plasmodium berghei* NK65 (PbNK65). **Métodos e Resultados:** Camundongos *Entpd1*^{-/-} (*knockouts* de CD39) foram infectados com 10⁶ eritrócitos parasitados em paralelo com camundongos selvagens (*WT*) para analisar o impacto do CD39 na patologia pulmonar. Nos dias 7 e 8 pós-infecção (p.i.), 60% dos camundongos de ambos os grupos morreram por SDRA-MA e apresentaram perda de peso corporal, escore clínico elevado e baixa parasitemia (18-25%). Observamos uma diminuição na frequência (≤ 200) e aumento na pausa respiratória (≥ 8), associadas ao edema pulmonar na histopatologia. Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros clínicos e respiratórios entre camundongos *WT* e *knockouts* de CD39. No dia 6 p.i., as células pulmonares foram analisadas por citometria de fluxo após a administração de um anticorpo anti-CD45 para diferenciar os compartimentos celulares parenquimatosa (CD45^{iv-}) e vascular (CD45^{iv+}). Nossos resultados revelaram um aumento de células T CD11a⁺CD4⁺ e CD11a⁺CD8⁺ nos pulmões e uma regulação positiva significativa da expressão de CD39 nessas células em camundongos *WT*. A análise comparativa indicou que a ausência de CD39 resultou em aumento do peso pulmonar e infiltração celular nos pulmões, correlacionando com um aumento significativo da população de células T CD11a⁺CD4⁺ em comparação com animais *WT* infectados. Não foi observada diferença significativa para a população de células T CD11a⁺CD8⁺. **Conclusões:** Dados preliminares sugerem que a CD39 regula a ativação de células T CD4⁺ nos pulmões durante a infecção. Esta pesquisa é apoiada pela FAPESP (2023/10839-0; 2022/00858-4; 2015/20432-8), CAPES (88887.659095/2021-00) e CNPq (303810/2018-1).

O BLOQUEIO DE RECEPTORES AXL E MERTK EM CELULAS DENDRÍTICAS NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR DE MEMÓRIA FRENTE À VACINAÇÃO COM BCG

Maia-Loiola, L.H¹; De-Oliveira, J.¹; Montuori-de-Andrade, A.C.M.¹; Gomes, T.F¹; Correa, A.A.S²; Denadai, M.B²; Costa, D.L^{1,2}.

1. Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo ICB-USP.
2. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Campus Ribeirão Preto FMUSP-RP.

Introdução e Objetivos: A tuberculose (TB) é uma doença causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A única vacina contra Mtb licenciada para administração em humanos é a BCG (Bacilo de Calmette e Guérin). Porém, essa vacina não induz uma resposta imunológica de memória eficiente em adultos. Logo, estratégias estão em desenvolvimento para aprimorá-la. Nossa hipótese é que o bloqueio dos receptores Axl e MerTK em células dendríticas (dendritic cell - DCs) melhore a resposta imune frente a BCG. Axl e MerTK fazem parte de uma família de receptores denominada TAM (Tyro3, Axl e MerTK), que possuem uma via de sinalização com papel supressor em DCs. Portanto, o objetivo deste trabalho é analisar os efeitos do bloqueio desses receptores para avaliar o desenvolvimento da resposta imune adaptativa e a geração de memória imunológica contra a Mtb. **Métodos e Resultados:** Em experimentos “*in vivo*” camundongos C57BL/6, Axl e MerTK knockout serão imunizados ou não com BCG, em concentração de 5×10^5 unidades formadoras de colônias (UFC), por via subcutânea ou intravenosa. Após 4 semanas, serão tratados por via oral com isoniazida por mais 4 semanas. Após 1 semana alguns grupos serão eutanasiados para análise e outros grupos serão desafiados ou não com 100 UFC de Mtb, inoculação por via intrafaríngea. Após 6 semanas de infecção os camundongos serão eutanasiados e as amostras coletadas para análises por citometria de fluxo. Para experimentos “*in vitro*” DCs derivadas de medula óssea de camundongos serão infectadas com BCG na presença de peptídeo ESAT-6 1-20 para quantificação da produção das citocinas TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12 por ELISA e análise por citometria de fluxo para expressão de MHC de classe II, CD40, CD80 e CD86. Para análise da proliferação de células do sistema imune adaptativo, linfócitos T com receptor de células T (T cell receptor - TCR) específico para peptídeo ESAT-6 1-20 isolados de camundongos C7 Tg TCR serão adicionados em poços de cultura com DCs para posterior quantificação da proliferação celular, produção de citocinas IFN- γ , TNF, IL-17 e IL-10, expressão de marcadores CD44, CD62L, CD69, CD103 e fatores de transcrição FoxP3, Tbet e ROR γ T. **Conclusão:** A compreensão de como receptores envolvidos na modulação da resposta efetora de células mielóides podem regular a geração de memória imunológica frente a BCG pode resultar em terapias farmacológicas direcionadas ao hospedeiro concomitantes à vacinação para melhor enfrentamento da TB. **Apoio financeiro:** FAPESP

Splenic macrophages communicate with the liver in acute systemic inflammation

Matos, Caroline M.; Nunes, Jessica R.; Salata, Giovana C.; Lopes, Luciana B.; Serezani, Carlos H.; Steiner, Alexandre A.

Universidade de São Paulo – USP- São Paulo (SP), Brasil.

Objective: Recent experiments from our laboratory revealed that the spleen plays an important role in regulating the production of TNF by liver macrophages, but the cellular phenotype in which the splenic signal is originated remains unknown. Here, we devised a method for the selective ablation of splenic macrophages and evaluated whether and how it affects the production TNF and IL-10 in the liver and lung.

Methods: We used a CRE-lox transgenic mouse strain that expresses humanized diphtheria toxin receptor selectively on macrophages, thus allowing their depletion to be induced by diphtheria toxin. We associated this genetic tool with a controlled-release liposomal platform to localize diphtheria toxin in the spleen. The liposome loaded with diphtheria toxin was microinjected into the spleen and, 24 h later, the mice were challenged with LPS (1 mg/kg i.p.). Samples of spleen, liver and lungs were collected 90 min post-LPS. Macrophage depletion was assessed by flow cytometry; cytokine expression was determined by quantitative RT-PCR.

Results: Microinjections of the liposomes loaded with diphtheria toxin into the spleen resulted in the depletion of resident macrophages in this organ, with no evidence of depletion of hepatic macrophages or splenic injury. There was no significant change in the number of neutrophils in these organs. We then proceeded to investigate how the depletion of spleen macrophages would affect the response of the liver and lungs to the LPS challenge. The splenic macrophage depletion attenuated the LPS-induced overexpression of *Tnf* and *Il10* in the liver. On the other hand, no inter-group different in expression of *Tnf* or *Il10* was observed in the lungs.

Conclusion: These findings identify that it is the splenic macrophages that convey TNF-enhancing signals to the liver in the LPS model of systemic inflammation.

Financial support: FAPESP and CNPq.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE LY6C EM CÉLULAS T CD4 IN VITRO E PAPEL DO IFN- γ NESTA EXPRESSÃO

Codognato, S.G., Souza, D.C., Raeder, P.H., Maxuel, S.M., Nascimento, R.S., Cantarini, D.G., Lima, M.R., Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos:

A malária é uma doença que afeta, principalmente, países tropicais do globo. Na resposta imunológica, as células B produzem anticorpos, as células T_{H1} secretam IFN- γ e as células T_{FH} auxiliam as células B. Dados internos do laboratório mostraram que uma população de células T_{FH} que expressam a molécula de Ly6C adquiriam características de células de memória, sendo fundamental o aprofundamento no entendimento da dinâmica dessa população.

Dados da literatura mostram que o IFN- γ tem um papel relevante na expressão do Ly6C nas células T. Nesse contexto, dada a relevância das células T para a resposta imune, a possibilidade de formação de células TFH de memória, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do IFN- γ na expressão do Ly6C em células T cultivadas *in vitro*.

Métodos e Resultados:

Os esplenócitos de camundongos C57BL/6, infectados (4 p.i.) ou *naive*, foram cultivados por 72 ou 96 horas, com ou sem eritrócitos infectados por *Plasmodium chabaudi* (1:4). As células foram analisadas por citometria e o sobrenadante de algumas culturas foi separado para medir o IFN- γ por ELISA.

A expressão da molécula de Ly6C nas células ativadas foi identificada nas células de um animal infectado mantidas por 96 horas em cultura, independentemente da presença dos eritrócitos infectados (iRBCs), com o grupo de células mantido em cultura com os iRBCs apresentando uma expressão mais intensa em relação ao que não recebeu o iRBCs. A troca de meio de cultura após as 48 horas iniciais não impediu a expressão do Ly6C nas células T, mas eliminou a diferença observada anteriormente.

Análise do IFN- γ por ELISA do sobrenadante da cultura (96 horas sem troca de meio) mostrou uma maior concentração do IFN- γ no sobrenadante das células do dia 4 p.i. estimuladas. Nas células de animais *naive* sem estímulo a dosagem foi nula, e tanto as células de um animal *naive* com estímulo como as células de um animal no dia 4 p.i. sem estímulo apresentaram níveis detectáveis de IFN- γ .

Foi feita a cultura utilizando células de camundongos PbTII, com células T que reconhecem antígenos do *Plasmodium*. A expressão de Ly6C nas células de um animal *naive* foi identificada já nas primeiras 72 horas de cultura assim como nas outros tempos de cultura, em células de animais previamente infectados ou não.

Conclusão:

O modelo de cultura com esplenócitos totais estimados por iRBC é válido, permitindo a observação da expressão de Ly6C em células T CD4+ de camundongos C57BL/6 e PbTII. Além disso, a expressão parece ser induzida por algum fator solúvel, sugerindo a importância de investigar o papel do IFN- γ nesse processo.

Apoio financeiro:

Apoio financeiro oferecido pela FAPESP (2015/20432-8) e CNPq (303810/2018-1/2023-1255).

ALVES, C.B.; SILVA, G.W.; ARAÚJO, M.V.; FONSECA, D.M. Laboratório de imunologia de mucosas, Departamento de Imunologia- Instituto de Ciências Biomédicas-USP

CULTURA DE CÉLULAS BHK-21 E PROPAGAÇÃO DO VÍRUS MODIFIED VACCINIA VIRUS ANKARA

Introdução e Objetivos: O vírus MVA (do inglês, Modified Vaccinia Virus Ankara) tem sido estudado e aplicado como plataforma vacinal há anos, tanto diretamente, quanto como um vetor viral. Algumas das justificativas para o seu amplo uso se dá por sua segurança, garantida pela especificidade da replicação viral, além do amplo conhecimento científico acerca deste, principalmente a respeito da informação gênica que este vírus carrega. Outro ponto a se destacar diz respeito às próprias condições de cultivo para a sua propagação, limitada a certas linhagens celulares permissivas em que se destaca a linhagem BHK-21 (do inglês, Baby Hamster Kidney). Este projeto é encarregado pela padronização na propagação deste vírus, na devida linhagem celular, e na sua purificação para que este possa ser utilizado em nosso laboratório e aplicado como ferramenta de vacina oral. Esta plataforma servirá para entender a contribuição imunológica de tecidos adiposos adjacentes ao intestino em um contexto prévio a infecções bacterianas, em relação à geração de memória celular. Também colaborando com essa linha de pesquisa, este trabalho engloba a cultura de bactérias transgênicas, como a *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, que serão utilizadas para testar essa resposta vacinal, incluindo as padronizações a respeito do crescimento e a cultura para uso. **Métodos e Resultados:** Para isso são necessárias metodologias diversas relacionadas a cultura da linhagem celular BHK-21 para propagação do vírus, além da realização do processo de ultracentrifugação do conteúdo viral obtido, a fim de purificá-lo, bem como a quantificação do título viral após a purificação pela técnica TCID₅₀, que mostrou um título viral alto e suficiente para o objetivo do projeto, entre 1×10^7 e 5×10^8 PFU/mL. Já em relação a cultura das bactérias transgênicas, o projeto conta com a padronização da curva de crescimento, em que foi realizado o plaqueamento em meio sólido e uma colônia foi isolada e transferida para tubos de cultura bacteriana contendo meio líquido e a cada 30 minutos durante 6 horas, 1mL da cultura foi coletada para a obtenção da DO (densidade óptica), em seguida, 100uL da cultura foi plaqueado por estriamento em ágar sólido e mantido em estufa a 37°C para contagem do UFC (unidades formadoras de colônia), estes dois parâmetros medidos permitiram a construção de curva de crescimento bacteriano, que no caso da *Salmonella* foi verificado que até 2h de crescimento a bactéria se encontrava em fase lag, a partir da segunda hora até a quarta hora, caracterizou-se a fase log e da quarta hora em diante foi visto que o crescimento entrou na fase estacionária. **Conclusões:** Portanto, os resultados obtidos neste projeto permitiram que linhas de pesquisa do laboratório, relacionadas à resposta imunológica a patógenos após a imunização com vetor viral, pudessem ser plenamente desenvolvidas a partir, principalmente, do purificado viral obtido e quantificado e a padronização do crescimento bacteriano.

Apoio Financeiro: PIBIC/CNPq

ROLE OF CD18 IN THE STRUCTURE OF VIRUS-CONTAINING COMPARTMENTS LOADED WITH HIV-1 IN MATURE DENDRITIC CELLS. Camargo, F.E.C., Souza, K.B.S., Bargieri, B.C.A., Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction and aims: Mature dendritic cells (mDCs) can bind HIV-1 through Siglec-1 (CD169), forming a membrane-connected virus-containing compartment (VCC). These VCCs keep virions protected from degradation and, upon interaction with CD4 T lymphocytes, are redirected to cell-to-cell contact regions. This process, known as transinfection, enhances CD4 T lymphocyte infection and may be involved in HIV dissemination. The process of VCC formation in DCs is not well understood, as CD169's cytoplasmic tail is short and lacks known internalization domains.

Methods and results: CD18 is the β -2 integrin chain and can be complexed with four different α chains (CD11a, CD11b, CD11c, and CD11d). CD18 is present in VCCs formed in HIV-1-infected macrophages, where it is important for their structure and formation. Therefore, the objective of this project is to study the role of CD18 and its alpha chains in VCC formation in DCs and in two cell line models expressing CD169. We have first confirmed the expression of CD18, CD11b and CD11c in primary monocyte-derived DCs. We could also observe by confocal microscopy the presence of CD18 in HIV⁺ DC VCCs. To develop the cell line model, U937 monocytic cells were transduced with a lentiviral vector expressing CD169, then sorted, generating U937-CD169⁺ cell line. Sorting was confirmed by flow cytometry and the majority (an average of 97%) of cells expressed CD169. THP-1-CD169⁺ cell line is under development and will be subjected to the same processes as the U937-CD169⁺ cell line. The expression of CD18, CD11b and CD11c was also confirmed in U937-CD169⁺ cell line model.

Conclusion: In the next steps, we will evaluate the presence of CD18 and its affinity conformation in U937 and THP-1 VCCs. We will also silence CD18 expression in DCs and cell lines to inquire upon its role in VCC structure. The elucidation of mechanisms involved in DC VCC formation can open new possibilities of therapeutic targets for HIV-1 dissemination control, as well as other pathogens that can bind to CD169.

Financial Support: CAPES, FAPESP e USP

ACTIVATION OF THE COMPLEMENT SYSTEM IN PATIENTS WITH LEPTOSPIROSIS-ASSOCIATED SEVERE PULMONARY HEMORRHAGIC SYNDROME

Carneiro, M.C.¹, da Silva, A.M.G.², da Silva, L.F.F.³, Neto, A.D.³, Isaac, L.¹

(1) Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, (2) Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, (3) Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Introduction and objectives: Leptospirosis is a neglected zoonosis, endemic in developing countries with tropical or subtropical climates. Approximately one million new cases are reported yearly with 5-10 deaths. Some patients develop a clinical condition called Leptospirosis-associated Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome (LPHS), with a mortality rate higher than 50%. The etiopathology of LPHS remains to be elucidated. Some evidence suggests that its progression is multifactorial and may be due to: (1) leptospiral toxins that can damage blood capillaries, affect vascular permeability, and allow the entry of a high number of bacteria into the tissues; and (2) an exacerbated immune response, causing a significant release of cytokines and anaphylatoxins that can affect tissue permeability, cause tissue damage and local hemorrhage. The deposition of C3 in the lungs of patients with LPHS has been previously reported, in human and animal models, suggesting that the activation of the Complement System may contribute to the hemorrhagic clinical picture. However, the role of the Complement System in LPHS still needs to be further investigated. Given this background, the objective of this project is to evaluate the potential activation of the Complement System in patients who died from LPHS and to identify the pathways involved in this process.

Methods and Results: Samples from dead LPHS patients (n=11) were used and compared to patients who died of sepsis (n=4) and cardiopathies (n=6). Histopathological analysis was carried out in the lungs, kidneys, and liver of the 3 groups. Immunohistochemical assays were performed to analyze the deposition of Complement proteins: C1q, Factor B, MASP2, C3c, C4d, C5b-9 and the presence of anaphylatoxin receptors C3aR1 and C5aR, in the 3 study groups. At the same time, immunoglobulins (IgG and IgM) deposition in the tissue and *Leptospira* antigens were evaluated. In the LPHS group, the lungs were observed to have a higher intensity of the hemorrhagic condition and a higher incidence of septal inflammation. In the liver, moderate and intense dissociation of hepatocyte levels, lobular and portal inflammation were observed. Furthermore, there was a higher presence of tubular injury and mesangial hyperplasia in the kidneys when compared to the controls. The pulmonary analysis revealed a higher deposition of C1q in the alveolar septum of LPHS patients, suggesting an activation of the Classical Pathway. We believe that understanding the contribution of Complement in LPHS can guide the future use of inhibitors as a treatment for patients.

Conclusion: The findings suggest that the Complement System, particularly the Classical Pathway, could play a crucial role in the pathology of LPHS. Understanding this contribution may guide the future use of Complement inhibitors as a treatment for patients.

Funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP)

CONTRIBUTION OF THE VISCERAL ADIPOSE TISSUE FOR THE ORAL VACCINE RESPONSE

Silva, G.W., Alves, C.B., Mandu-Gonçalves, L., Oliveira, E.E., Rodrigues, G.M.B., Abreu, A.M., Costa, L.M., Lima, G.M., Conceição, L.B., Ayupe, M.C., Nascimento, E.A.G.M., Salgado, C.L., Oliveira, B.C., Prestes, A.V.C., Araújo, M.V., Fonseca, D.M. Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introduction and goals: The intestinal mucosa is one of the largest areas of the body exposed to the external environment. It operates in the absorption of nutrients, elaboration of responses against pathogens and affords immunological tolerance to innocuous antigens. Different studies indicate that other mechanisms and organs can act to ensure homeostasis in mucosal tissues, such as adjacent visceral adipose tissues (VAT). Adipose compartments, such as mesentery and omentum, and others non-lymphoid tissues, have already been described as memory cells reservoir after oral infections. Therefore, in this project, the main goal is to elucidate the VAT as a reservoir of memory cells derived from oral vaccines. As specific goals, we target the measurement of the immunological efficacy of different experimental oral vaccines, especially based on a viral vector platform, and then the contribution of adipose tissues for the tested oral vaccines. **Methods and results:** First, we tested different experimental oral vaccine candidates: oral unpurified recombinant Modified Vaccinia Ankara virus that express ovalbumin (rMVA), sublingual purified rMVA, oral double mutant heat labile toxin/ovalbumin (dmLT/OVA), and a prime-boost system using sublingual MVA and dmLT/OVA simultaneously. The virus acts as a vector and the bacterial toxin acts as an adjuvant. C57BL/6 CD45.1 mice were immunized with 2 or 3 oral doses of the respective vaccines. Previously, we transferred OVA-specific CD45.2 cells intraperitoneally. We performed flow cytometry, and the humoral response was evaluated by ELISA assays. We found the best oral vaccine platform was the dmLT/OVA. In terms of the humoral response, dmLT/OVA induced the highest levels of OVA-specific IgG1 and IgG2a antibodies in the serum, and OVA-specific IgA in the intestinal lavage. About the cellular response, dmLT/OVA and prime-boost induced Th17, T CD4⁺ CD44⁺, T CD8⁺ CD44⁺ and T CD8⁺ KI67⁺ cells in the small intestine lamina propria after the immunizations. Vaccines based only in the viral vector presented low immunogenicity. After 2 doses, dmLT/OVA was the only one that provided OVA-specific cells in the omentum of the immunized mice, compared to the other vaccine candidates. **Conclusions:** Taken together, these results suggest the immunological efficacy of the use of dmLT as an adjuvant for oral vaccines. They also suggest an immunological role of the VAT and a contribution of these tissues for the oral vaccine response. We believe the omentum act as a reservoir of memory cells induced by this oral vaccine. We hope to evaluate the protective role of this memory cells and understand the involved mechanisms.

Financial support by FAPESP and CNPq

BLOQUEIO DO METABOLISMO DA GLUTAMINA E SEUS EFEITOS NO MICROAMBIENTE TUMORAL

Marques, L.F., Lepique, AP., Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: As células tumorais apresentam reprogramação metabólica, sendo a glicólise aeróbica a mais bem caracterizada. No entanto, muitos tumores dependem concomitantemente da glutaminólise para obtenção de energia e intermediários catabólicos, uma via mediada principalmente pela enzima glutaminase. As células tumorais e as células imunes compartilham similaridades metabólicas e os tumores podem modular a resposta imune por meio da competição por nutrientes e da geração de metabólitos. Há evidências de que a inibição da glutaminase, em macrófagos associados a tumores (TMA), impacta negativamente o fenótipo M2. Nossa hipótese é que a inibição da glutaminólise diminuirá o crescimento do tumor devido aos efeitos negativos diretos no metabolismo das células tumorais e facilitando uma mudança nos macrófagos em direção a um fenótipo citotóxico. Com isso, nosso objetivo é verificar o efeito da inibição da glutaminólise em células do microambiente tumoral, células tumorais e imunes, esperando atingir esses dois alvos simultaneamente e com isso reduzir a viabilidade das células tumorais e modular o fenótipo dos macrófagos para um perfil citotóxico e antitumoral.

Métodos e Resultados: Trabalhamos com linhagens celulares derivadas de câncer cervical tumoral (SiHa e SW756) em cocultura com células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e monócitos isolados por meio da técnica de sorting em citometria de fluxo, utilizamos ainda esferóides tumorais para mimetizar o microambiente tumoral. A inibição da glutaminase foi feita usando as substâncias BPTES ou Composto 968 e os tratamentos levaram à efeitos tóxicos em células tumorais e um acúmulo de células mortas na fase sub-G1 do ciclo celular. Além disso, células CD3 positivas (linfócitos), após tratamentos e cocultura com tumor, tiveram sua viabilidade pouco afetada, enquanto ambos os inibidores foram tóxicos para monócitos nas mesmas condições. Nosso segundo interesse estava relacionado à compreensão dos imunofenótipos de monócitos isolados após tratamento e cocultura. Selecionamos marcadores estratégicos para avaliar os fenótipos M1 e M2. Ambos os inibidores aumentaram a porcentagem e a intensidade média de fluorescência (MFI) das populações CD80, CD206, HLA-DR e CD80/CD206 duplo-positivos, demonstrando uma possível ativação e modulação do fenótipo destas células imunes.

Conclusão: Em conclusão, nossos dados indicam que a inibição da glutaminase pode ser uma ferramenta útil na terapia do câncer cervical e os tratamentos tiveram efeitos imunomoduladores em macrófagos do microambiente tumoral.

Apoio Financeiro: FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e CAPES.

INFLAMAÇÃO CRÔNICA COMO FATOR DE PROGRESSÃO PARA CÂNCER ASSOCIADO AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Colonna, F.C., Beldi, M.C., Pombo, F.C.N., Lepique, A.P., Departamento de
Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos:

A infecção por Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco é o principal fator etiológico para câncer cervical. O genoma do HPV codifica oncogenes E6 e E7, que degradam p53 e pRb e induzem a expressão de hTERT, immortalizando células epiteliais. No entanto, o HPV sozinho não é suficiente para causar câncer; outros fatores de risco são necessários. O lactato, subproduto do metabolismo glicolítico das células tumorais, é transportado para outras células tumorais via transportadores de monocarboxilato (MCTs), influenciando células imunes e tumorais. Também atua como molécula de sinalização pelo receptor GPR81. Níveis elevados de lactato em tumores estão associados à recorrência tumoral e à sobrevivência dos pacientes. Em pacientes com HPV, a expressão de MCT correlaciona-se com a gravidade das lesões. Em células endoteliais, o lactato estimula a expressão de NF- κ B e IL-8 via MCT1. Nosso objetivo é avaliar o papel do lactato contribuindo não só como substrato metabólico, mas também como molécula sinalizadora na carcinogênese induzida pelo HPV.

Métodos e Resultados:

Foram utilizadas células de queratinócitos humanos immortalizados (HaCaT) transduzidas com as oncoproteínas E6 e E7 (HaCaT E6E7) ou com um vetor vazio (HaCaT pLXSN), além de células tumorais derivadas de câncer cervical (SiHa, HPV 16 e HeLa, HPV 18). As células foram tratadas com L-lactato em várias concentrações. Medimos proliferação celular, formação de colônias, ciclo celular, expressão de NF κ B. PBMCs foram adicionadas isoladamente ou em co-cultura com células immortalizadas e tumorais para avaliar a modulação da expressão de NF κ B e citocinas pró-inflamatórias.

O lactato promove a proliferação de células tumorais, mas não de células E6E7. A exposição prolongada ao lactato promove a formação de colônias em células E6E7. Lactato altera o ciclo celular, aumentando as fases S e G2/M em células tumorais e immortalizadas com E6 e E7 e aumenta a expressão de NF κ B. A adição de células do sistema imune diminui a expressão de NF κ B em comparação com as células E6E7. A expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, IL-6 e IL-1 β diminuiu em PBMCs na presença de lactato, mas aumenta em células E6E7.

Conclusões:

O lactato atua ativando NF κ B em células tumorais e immortalizadas E6E7 revelando um vínculo entre metabolismo celular e sinalização influenciada pelas oncoproteínas E6 e E7. Observamos uma dualidade na comunicação entre células immortalizadas e células do sistema imune. Quando cultivadas juntas, esse efeito pró-tumoral é recuperado pela influência das células E6E7. As descobertas sugerem que o lactato exerce uma influência sistêmica nas células imunes em resposta ao microambiente modificado pelas oncoproteínas E6 e E7, destacando a ativação da via de sinalização do NF κ B.

Apoio Financeiro: CAPES

EFFECT OF A PROBIOTICS IN THE PROTECTION INTESTINAL BARRIER FOLLOWING YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS INFECTION

RODRIGUES, G.M.B.; MANDU-GONÇALVES, L; SILVA, G.W.; OLIVEIRA, E.O.; ARAUJO, M.V.; LIMA, G.M.; DE OLIVEIRA, B.C.; ALVES, C.B.; ABREU, A.M.; COSTA, L.R.; CONCEIÇÃO, L.B.; PRESTES, A.V.C.; MOREIRA, F.; SALGADO, C.L.; AYUPE, M.C.; MARTINS, F.S.; FONSECA, D.M., Immunology Department, Institute of Biomedical Sciences, USP.

Introduction and objectives: The intestinal mucosa is constantly exposed to antigens, such as pathogens and innocuous dietary- and commensal microbiota-derived antigens which influences tissue-homeostasis. Our group studies how probiotics, dietary changes or infection episodes, can shape the gut-associated mucosal immune system. We observed that after the resolution of *Yersinia pseudotuberculosis* (YP) infection, there is a permanent remodeling of the immune and lymphatic systems of the gastrointestinal tract, which leads to microbiota translocation to the mesentery, resulting in chronic local inflammation. This process, named by us “immunological scarring”, is directly related to the susceptibility to experimental colitis. Therefore, preventing the immunological scar could hinder this process. Data from the literature shows that the *Saccharomyces cerevisiae* (SC) UFMG A-905 treatment reduced intestinal permeability and preserved the tissue architecture in a mucositis model. In this context, we hypothesized that the treatment with SC UFMG A-905 could recover the integrity of the mesenteric lymphatic system, and thus, the migratory capacity of the CD103⁺ dendritic cells (DCs), crucial for inducing tolerogenic responses in the intestine. **Methods and Results:** Testing on C57BL/6 mice involved two strategies: (1) treatment 4 weeks post-infection, to reverse the immunological scar, and (2) pre-treatment one week before YP infection, continuing until pathogen elimination, to prevent the immunological scar. We examined gut, mesentery, and mesenteric lymph nodes via histopathology and flow cytometry. Our results showed that both strategies not only did not protect, but worsened chronic inflammation in treated animals, indicated by increased neutrophil and Th1 recruitment to the mesentery and mesenteric lymph nodes post-infection. The treatments also failed to recover the integrity of the mesenteric lymphatic vessels, since the treated animals showed a reduced frequency of double-positive and CD103⁺ DCs in the lymph nodes. **Conclusion:** Contrary to our hypothesis, both strategies worsened the symptoms caused by the immunological scar. We believe that, in this context, the probiotic consumption may be increasing the bacterial load translocated to other organs due to the damage in the intestinal barrier. The next step of our study is to access the integrity of the intestinal barrier and the microbiota translocation in treated animals following infection.

Keywords: Mucosal Immunology, Probiotics, Infection.

Financial Support: FAPESP, CAPES, CNPq.

DYSFUNCTIONALITY IN LOCAL REGULATORY T CELL IN THE GUT MUCOSA POST-INFECTION CONTRIBUTES TO COLORECTAL CANCER ESTABLISHMENT

Gonçalves, L.M., Conceição, L.B., Silva, G.W., Rodrigues, G.M.B., Oliveira, B.C., Moreira, F., Araujo, M.V., Lima, G.M., Abreu, A.M., Alves, C.B., Costa, L.R., Gomes, E.M., Lepique, A.P., Oliveira, E.E., Fonseca, D.M., Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences - ICB/USP

Colorectal cancer (CRC) is among the most lethal intestinal diseases, claiming approximately 1 million lives globally each year, with an incidence rate of around 2 million cases annually, presenting a significant public health challenge. Investigations into the etiology of CRC and strategies to enhance patient survival have highlighted the role of infectious episodes in disrupting intestinal immune homeostasis. Our research indicates that the resolution of certain acute gastrointestinal infections, typically considered benign, leads to permanent remodeling of the immune and lymphatic systems in the gastrointestinal tract and adjacent organs, such as the mesentery and mesenteric lymph nodes. This remodeling results in chronic local inflammation, impairing specific regulatory responses in the intestinal mucosa. We have demonstrated that this chronic inflammatory environment increases susceptibility to inflammatory bowel diseases, prompting the hypothesis that a similar process could occur with CRC. To test this, we infected C57BL/6 mice with *Yersinia pseudotuberculosis* (YP) and, after bacterial clearance, we induced CRC by azoxymethane and dextran sodium sulfate treatment. On the contrary to our initial hypothesis, Mice previously infected with YP exhibited fewer countable tumors compared to *naïve* mice, suggesting that the prior infection might protect against cancer development. Concurrently, we observed that T_{reg} lymphocytes in the colonic lamina propria of YP-infected mice are dysfunctional, as they fail to control inflammation in both the T cell transfer colitis model and in vitro suppression assays. We believe that T_{reg} dysfunction post-YP infection may favor immune surveillance and support the reduction in tumor development, given that the tumor microenvironment typically recruits T_{regs} as an immune escape mechanism, and post-infection, these cells are unable to function correctly.

Financial Support: FAPESP, CAPES, CNPq, L'óreal for Women in Science

ROLE OF MIRNAS MIR-294 AND MIR-302 IN THE REGULATION MACROPHAGES ACTIVATION DURING *LEISHMANIA* INFECTION

Oliveira, V., Teixeira, C. A., Zanatta, J. M., Eleutério, B.P., Muxel, S. M., Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction: *Leishmania* is an obligate intracellular parasite in the mammalian host, infecting phagocytic cells of the immune system. Inside the macrophage, the amastigote form is capable of subverting the hostile environment of the phagolysosome modulating host gene expression for its survival. MiRNAs are small non-coding RNAs that regulate gene expression by pairing their seed (6-9 nt) with the complementary 3'UTR sequence of the target mRNA, promoting degradation or inhibition of mRNA translation. The miR-294 and miR-302 acts regulating the *Tnf* and *Nos2* mRNA genes, reducing NO production and increasing infection with *L. amazonensis*. Therefore, it is important to understand the correlation between parasite survival and the expression of miRNAs and their target genes in macrophages infected by *L. infantum*, which causes visceral leishmaniasis, and how the modulation of these molecules impacts the activation of the pro-inflammatory response and subversion of the host's response to the parasite.

Objective: We formulated the hypothesis that infection with *L. infantum* increases the expression of miR-294 and miR-302 and these affect the mRNA levels of target genes related to the production of cytokines and NO in macrophages. Here, we aimed to investigate their influence on the regulation of the expression of miR-294 and miR-302 during the response of macrophages infected with *L. infantum*.

Methods and Results: We initially tested the expression of miRNAs primers for RT-qPCR for each gene miR-294 and miR-302d with amplification in distinct regions of the mature miRNA from samples of Bone Marrow-Derived Macrophages from BALB/c infected with *L. amazonensis* and *L. infantum* or stimulated with LPS (100 ng/mL) for 4 and 24h.

Discussion and Conclusion: We observed an increase in the expression of miR-294 and miR-302 at 4 and 24 hours of infection, in macrophages infected with *L. amazonensis* and *L. infantum*, compared to uninfected or LPS stimuli. Furthermore, we showed an increase in the expression of pre-miR-294 and pre-miR-302 at 4 hours of infection, which can be correlated with the increased rate of infection. These miRNAs share the same seed sequence, 6-8 nucleotides binding site to 3'UTR of target-mRNA, as mmu-miR-294-3p and mmu-miR-302d-3p, showing the *Nos2* and *Tnf* as a functional target, indicating the potential to evaluate the miRNA regulation of macrophage activation during infection. Our data suggest the infection influenced the regulation of miR-302 and miR-294. Using miRNAs mimics or inhibitors we could understand the modulation of macrophage activation and infectivity outcome. In conclusion, this study helps to comprehend the molecular mechanisms involved in the establishment of *Leishmania* infection in macrophages focusing on miRNA activity.

Keywords: microRNA, Leishmania, macrophage

Financial : CNPq, FAPESP

CONTRIBUTION OF THE VISCERAL ADIPOSE TISSUE FOR ORAL VACCINE-INDUCED RESPONSES

Silva, G.W., Alves, C.B., Mandu-Gonçalves, L., Oliveira, E.E., Rodrigues, G.M.B., Abreu, A.M., Costa, L.M., Lima, G.M., Conceição, L.B., Ayupe, M.C., Nascimento, E.A.G.M., Salgado, C.L., Oliveira, B.C., Prestes, A.V.C., Araújo, M.V., Fonseca, D.M. Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introduction and goals: The intestinal mucosa is one of the largest areas of the body exposed to the external environment. It operates in the absorption of nutrients, elaboration of responses against pathogens and sustains immunological tolerance towards innocuous antigens. Recent studies have indicated that not only the gut-associated lymphoid tissue, but also other organs can act to ensure homeostasis in mucosal tissues, such as adjacent visceral adipose tissues (VAT). Adipose compartments, such as mesentery, and other non-lymphoid tissues, have already been described as memory cell reservoirs, but it is not clear whether these tissues could also sustain mucosal vaccine induced memory cells. Therefore, our main goal is to elucidate the contribution of VAT, particularly the mesentery and omentum, as major reservoirs of memory cells derived from oral vaccines. As specific goals, we target the measurement of the immunological efficacy of different experimental oral vaccines, especially based on a viral vector platform, and then the contribution of adipose tissues for the tested oral vaccines. **Methods and results:** First, we tested different experimental oral vaccine candidates: oral unpurified recombinant Modified Vaccinia Ankara virus expressing ovalbumin (rMVA), sublingual purified rMVA, oral double mutant heat labile toxin/ovalbumin (dmLT/OVA), and a prime-boost system using sublingual MVA and dmLT/OVA simultaneously. C57BL/6 CD45.1 mice, transferred with OVA-specific CD45.2, were immunized with the respective vaccines. We performed flow cytometry, and the humoral response was evaluated by ELISA assays. We found the best oral vaccine platform was the dmLT/OVA. Regarding the antigen-specific humoral response, dmLT/OVA induced the highest levels of OVA-specific IgG1 and IgG2a antibodies in the serum, and OVA-specific IgA in the intestinal lavage compared to all vaccine formulations. However, both dmLT/OVA and the prime-boost system were more efficient in promoting the activation of cellular adaptive responses, inducing Th17, TCD4+CD44+, TCD8+CD44+ and TCD8+KI67+ cells in the gut lamina propria after the immunization. The homologous vaccines based only in the viral vector presented low mucosal immunogenicity. Notably, dmLT/OVA was the only formulation that elicited OVA-specific cells in the omentum of the immunized mice, compared to the other vaccine candidates. **Conclusions:** Taken together, these results indicate the use of dmLT as an adjuvant for oral vaccines and also suggest that the omentum can contribute as a reservoir of antigen-specific vaccine activated T cells. Further studies are ongoing to evaluate the protective role of omentum-residing memory T cells for the efficacy of dmLT-OVA vaccine against OVA-expressing gut bacterial infection, particularly *Salmonella typhimurium*.

Financial support by FAPESP, CAPES and CNPq

CÉLULAS MIELODERIVADAS SUPRESSORAS PODEM FACILITAR A PROGRESSÃO DO CÂNCER CERVICAL AO INIBIR A RESPOSTA IMUNE DOS LINFÓCITOS T

Da Cruz, L.L.P., Lasso J.A.L., Genta M.L.N.D., Lepique A.P.

Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introdução

A interação entre células cancerígenas e a resposta imunológica do hospedeiro tem sido objeto de extensa pesquisa há muito tempo. Tumores frequentemente abrigam várias populações de leucócitos, incluindo linfócitos T e células mieloderivadas supressoras (MDSCs), que podem modular a resposta imune contra o câncer. Essas células mieloides imaturas originárias da medula óssea, podem se acumular em tecidos linfoides e no microambiente tumoral. Estudos associaram a progressão do câncer cervical a um alto número de neutrófilos circulantes e níveis elevados de G-CSF, indicando um fenótipo imunossupressor em células mieloides. O fenótipo imunossupressor depende da ativação de diferentes vias de sinalização intracelular, entre elas a via JAK2/STAT3 que promove a transcrição de genes, cujos produtos promovem proliferação celular, diferenciação, apoptose, angiogênese, inflamação, e que pode ser ativada via IL-6, G-CSF e IL-10.

Objetivos

Investigar se populações mieloides circulantes em pacientes com câncer cervical exibem um fenótipo supressor em linfócitos T e se ao bloquear a via STAT3 nas MDSCs esse efeito pode ser revertido.

Métodos

Avaliar, por meio de citometria de fluxo, a frequência de células mieloderivadas supressoras de pacientes com câncer cervical e investigar seu potencial imunossupressor na ativação e proliferação de linfócitos T. Além disso, bloquear a atividade da via STAT3 em células mieloides dessas pacientes para verificar se o fenótipo supressor pode ser revertido.

Resultados

A análise por citometria de fluxo revelou uma frequência mais alta de células CD66b+ no sangue periférico de pacientes em comparação com controles saudáveis. Ensaios de imunofluorescência mostraram aumento da expressão de STAT3 em células CD66b+ em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com câncer. O ensaio de imunossupressão revela um fenótipo supressor das células mieloderivadas supressoras na ativação e proliferação de linfócitos T, no entanto quando a via de STAT3 é inibida esse efeito é revertido.

Conclusões

Esses achados sugerem uma correlação entre o fenótipo imunossupressor mediado por células CD66b+ e a ativação da via STAT3. Este estudo destaca o papel das MDSCs na progressão do câncer cervical e sublinha o potencial de direcionar a via STAT3 para restaurar a função dos linfócitos T e melhorar os resultados terapêuticos.

THE IMMUNOMODULATORY ROLE OF THE SPLEEN-LIVER AXIS: INFLUENCE OF POST-SPLENECTOMY INTERVAL AND POST-LPS TIME

Sales, M.O.R., Kato, K.T., Lino, C.A., Trzan, I.F.L., Ferreira, G.C.S., Matos, C.M., Feitosa, D.D.M., Steiner, A.A.

Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences – USP

Introduction and Objectives:

Previous results from our group uncovered a spleen-liver axis that modulates the TNF production in systemic inflammation. Our hypothesis is that humoral signals from splenic macrophages enter the bloodstream and travel to the liver, where they interact with the hepatic resident macrophages (Kupffer cells) to modulate their TNF response to LPS. The present study was conducted to deepen our knowledge of this spleen-liver axis, evaluating the influence of (1) the interval between the splenectomy and LPS administration; and (2) the time after LPS injection in which TNF is measured.

Methods and Results:

Male Wistar rats were subjected to catheterization of the left jugular vein followed by splenectomy (SPLEX group) or sham operation. Two or fourteen days later, the animals were challenged with LPS (1 mg/kg i.v.). The liver was harvested 50 or 80 min after the LPS injection. *Tnf* expression was assessed by RT-qPCR.

The study revealed that the LPS-induced expression of *Tnf* in the liver was attenuated by splenectomy only when this was done 2 days before the LPS challenge and when *Tnf* expression was assessed 50 min after the LPS injection. The other combinations of the experimental conditions (2 days post-splenectomy with 50 min post-LPS; 14 days post-splenectomy with 50 min post-LPS; and 14 days post-splenectomy with 80 min post-LPS) did not result in a detectable effect of splenectomy on the liver *Tnf* expression.

Conclusion:

These results show a time-dependance of the modulation of *Tnf* expression by the spleen-liver axis in the LPS-induced systemic inflammation. Besides, because the effect of the splenectomy was not evident when we waited longer to do the LPS challenge, we infer that the observed effects on *Tnf* expression were not the result of compensatory mechanisms for the loss of the spleen.

Financial support: CNPq, CAPES and FAPESP.

THE SPLANCHNIC NERVES SUBDUCE NEUTROPHIL ACTIVITY IN A RAT MODEL OF SEPTIC PERITONITIS

Kato, K.T., Ferreira, G.C.S., Moretti, E.H., Fonseca, D.L.M., Lino, C.A., Muxel, S.M., Cabral-Marques, O., Steiner, A.A.

Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction and objectives

The immune response requires precise regulation, which is achieved by multiple layers of regulatory mechanisms. Sympathetic nerves are known to be involved, but their specific roles in infectious diseases are still poorly understood. Recently, we observed that bilateral splanchnicectomy (SplanX) substantially enhances bacterial clearance in the early stages of *E. coli*-induced septic peritonitis, without affecting the infiltration of the primary and secondary sites of infection by neutrophils. We have now sought for changes in the cellular activation profile of leukocytes.

Methods and results

Wistar rats were subjected to SplanX or sham operation and, one week later, had an *E. coli*-soaked gauze implanted intraperitoneally. The peritoneal lavage was collected at 6 hours of infection for Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) and immunoenzymatic tests (ELISA) analysis. scRNA-seq analysis showed a differential expression of 9 clusters. Clusters 0, 1, 2, 3, 5 and 6 had expression signatures of neutrophils, whereas clusters 4, 7 and 8 had signatures of monocytes, erythrocytes and endothelial cells, respectively. The neutrophils clusters could be subdivided based on the expression of the alarmins S100A8 and S100A9, with clusters 0, 3 and 6 having high expression of S100A8 and S100A9 (activated neutrophils) and clusters 1, 2 and 5 having low expression of these genes (quiescent neutrophils). Greater numbers of activated neutrophils were noticed in the SplanX group compared to the Sham group. Accordingly, immunoenzymatic tests revealed an increase not only in the release of the S100A9 in the peritoneal lavage of the SplanX group, but also in the release of a neutrophil granule protein (BPI).

Conclusion

These results indicate splanchnic nerves reprogram neutrophils to a less active state in the acute phase of an infection. The implications of this neuroimmunomodulatory mechanism to coping with the infection while minimizing collateral damage to the host remains to be evaluated.

Financial support: FAPESP, CAPES e CNPq

Role of the Purinergic System in Cerebral Malaria Pathogenesis: Insights from Experimental Models and Future Direction

RODRIGO J.R.X FREITAS¹, MARCOS VINÍCIOS PINHEIRO CIONE², LUCIANA DOS SANTOS BARROS MANHÃES², ROGÉRIO SILVA DO NASCIMENTO³, PAULO HAEDER³, DANILO CHAVES³, SOPHIA GRATON³, MARIA REGINA D' IMPÉRIO LIMA³.

Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Cerebral malaria leads to severe damage to the cerebral microvasculature, dysfunction of the blood-brain barrier (BBB), elevated extracellular ATP (eATP) levels, and neuroinflammation. ATP activates the purinergic receptor P2X7, amplifying inflammatory responses in leukocytes and glial cells. CD39 ectonucleotidases hydrolyze eATP to adenosine, which has anti-inflammatory properties. We evaluated the role of P2X7 and CD39 in the immunopathogenesis of experimental cerebral malaria. C57BL/6 (WT) mice were infected with *Plasmodium berghei* ANKA parasites, leading to significant weight loss and increased parasitemia by the 3^o day post-infection (dpi). Neurological symptoms peaked by the 6^o dpi, coinciding with a 70% mortality rate. By this time, BBB dysfunction was confirmed via Evans blue staining. The histopathological findings reveal significant vascular damage due to infection, with the brainstem being most affected, followed by the cerebellum and olfactory bulb. Hemorrhages and congested vessels are particularly noted in these areas, indicating severe inflammatory response and vascular dysfunction. Brain tissue analysis showed a significant increase in CD3⁺ cells, predominantly CD8⁺ T cells (86%) and CD4⁺ T cells (12%), which exhibited elevated expression of CD11a, CD39, P2X7, PD1, and Ly6C. Glial cells displayed an increased frequency of CD11b⁺ CD45^{hi} TMEM119⁺ cells with upregulated CD80, CD86, and CD40L expression, alongside reduced MHC II expression. Additionally, GFAP⁺ cell numbers increased, showing enhanced CD40L, MHC II, and CD80 expression. Furthermore, mice lacking CD39 (*Entpd1*^{-/-}) or P2X7 (*P2rx7*^{-/-}) were infected to compare their pathology with WT mice. *Entpd1*^{-/-} mice showed early signs of neurological impairment, with clinical scores beginning to increase significantly from the 4^o dpi. By the 6^o dpi, *Entpd1*^{-/-} mice exhibited a mortality rate of 100%, highlighting their heightened susceptibility to cerebral malaria. In contrast, WT mice had a mortality rate of 70%, while *P2rx7*^{-/-} mice showed a much lower mortality rate of 5%. This study provides initial insights into the role of the purinergic system in cerebral malaria (CM) pathogenesis, with ongoing research planned. FAPESP, CNPq grant

Keywords: Cerebral malaria, Purinergic system, blood brain barrier

THE ROLE OF MYOSIN IXB (MYO9B) IN NLRP3 INFLAMMASOME ACTIVITY IN THP-1 CELLS

Souza, K. B. S., Bayerlein, M. J., Pontillo, A., Bargieri, B. C. A. Department of Immunology, ICB/USP

Introduction and aim: Myosins are a family of actin-dependent motor proteins involved in cellular migration, endocytosis, exocytosis, vesicular trafficking and intracellular signaling. Leukocytes express distinct types of myosins required for cell function. The unconventional myosin IXB (Myo9b) is highly expressed in immune cells and contain a RhoGAP domain that negatively regulates small GTPases of the Rho family. Rho GTPases can modulate NLRP3 and Pypin inflammasome activation, via Pak1/2 and PKN1/2, respectively. In addition, inflammasome assembly also depends on cytoskeleton reorganization while mutations and polymorphisms in cytoskeletal components are associated with autoinflammatory diseases, which involve inflammasome activation. Considering that Myo9b participates in the regulation of the actin cytoskeleton, and the actin cytoskeleton modulates inflammasome assembly, this work aims to investigate the role of Myo9b in the modulation of NLRP3 inflammasome activation.

Methods and results: For that, lentiviral vectors carrying shRNA were transduced into the monocytic cell line THP-1. Two different shRNA sequences were chosen to generate Myo9b knockdown (KD), as ascertained by qPCR and Western blotting. With the model validated, THP-1 cells were differentiated into macrophages with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and were used for inflammasome activation after LPS priming and nigericin stimulation. IL-1 β release by THP-1 cells expressing Myo9b shRNA#3 and #4 was decreased, as compared to control cells expressing non-targeting shRNA (Scr). In the Myo9B KD THP-1, immunofluorescence showed reduced formation of ASC-specks compared to control cells.

Conclusions: So far, our results suggest that Myo9b plays a role in NLRP3 inflammasome activation. Our next steps will be to explore the molecular mechanisms behind it, including specific involvement of the Rho GTPase family members.

Financial support: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Universidade de São Paulo (USP)

BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN IMMUNOTHERAPY INDUCES AN EFFICIENT ANTITUMOR RESPONSE TO CONTROL MURINE MELANOMA DEPENDING ON MYD88 SIGNALING

Borges, V.M.¹, Marinho, F.V.², Caldeira, C.V.A.², de Queiroz, N.M.G.P.^{2,*}, Oliveira, S.C.^{1,2,3,*}

¹Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

²Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³Institut Pasteur de São Paulo, São Paulo, Brazil

*These authors share senior authorship and last authorship.

Introduction and Aim: Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is the first line treatment for bladder cancer and it is also proposed for melanoma immunotherapy. BCG modulates the tumor microenvironment (TME) inducing an antitumor effective response, but the immune mechanisms involved still poorly understood. In order to explore these immunological mechanisms, we aimed to characterize the immune profile of B16-F10 murine melanoma cells and investigate several innate immune pathways possibly involved in the BCG tumor immunotherapy by using knockout (KO) mouse.

Methods and Results: The immune profile of B16-F10 murine melanoma cells was assessed by infecting these cells with BCG or stimulating them with agonists for different innate immune pathways such as TLRs, inflammasome, cGAS-STING and type I IFN. B16-F10 did not respond to any of those stimuli, except for type I IFN agonists, contrasting with bone marrow-derived macrophages (BMDMs) that showed high production of proinflammatory cytokines. Additionally, we confirmed that BCG is able to infect B16-F10, which in turn can activate macrophages and spleen cells from mice in co-culture experiments. Furthermore, we established a subcutaneous B16-F10 melanoma model for intratumoral BCG treatment and compared wild type mice to TLR2^{-/-}, TLR3^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR7^{-/-}, TLR3/7/9^{-/-}, caspase 1^{-/-}, caspase 11^{-/-}, IL-1R^{-/-}, cGAS^{-/-}, STING^{-/-}, IFNAR^{-/-}, MyD88^{-/-} deficient animals. These results *in vivo* demonstrate that MyD88 signaling is important for BCG immunotherapy to control melanoma in mice. Also, BCG fails to induce cytokine production in the co-culture experiments using B16-F10 and BMDMs or spleen cells derived from MyD88^{-/-} compared to wild-type (WT) animals. Immunotherapy with BCG was not able to induce the recruitment of inflammatory cells in the TME from MyD88^{-/-} mice, impairing tumor control and IFN- γ production by T cells.

Conclusion: In conclusion, MyD88 impacts on both innate and adaptive responses to BCG leading to an efficient antitumor response against melanoma.

Funding: This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico -CNPq (grants # 152478/2022-1, 303044/2020-4 and 406974/2023-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES (88887.883409/2023-00), Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (grants # 2017/24832-6, 2023/06778-5, and 2023/02577-5).

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

BACTERIÓFAGOS EM ISOLADOS BACTERIANOS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

1, E.J., Vicente; 2, M.R.L., Simionato; 3, A.T., Barbosa. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas/USP

Introdução e Objetivos: Bacteriófagos (fagos) são vírus que infectam procariotos (bactérias e arqueias) e somente são capazes de se replicar dentro desses microrganismos infectados. Eles são muito específicos para as espécies e mesmo para diferentes linhagens que podem infectar. Os virulentos, multiplicam-se somente pelo ciclo lítico; e os temperados podem seguir o ciclo lisogênico ou o lítico. Os fagos são as entidades biológicas mais abundantes e diversas da biosfera, são encontrados onde quer que exista bactérias e estima-se haver mais de 10^{31} no planeta (Clokier et al. 2011). O objetivo desse trabalho foi analisar, em águas urbanas, a presença de bactérias resistentes aos antibióticos e a presença de fagos líticos e de fagos lisogênicos inseridos no genoma de bactérias; visando num trabalho futuro identificar novos compostos que tenham a capacidade de induzir a entrada no ciclo lítico de isolados bacterianos MDR.

Métodos e Resultados: Etapas seguidas: 1) Foram coletadas amostras de 50 ml de água de várias localidades urbanas (2 Lagos em Praças, 2 pequenos rios, filtro caseiro, Raia USP, etc.); 2) diluições foram semeadas em meio TSA e MacConkey; 3) colônias isoladas foram platinadas nos meios MacConkey+Ampicilina 100µg/ml; e MacConkey+Ciprofloxacina 25µg/ml ((Sub-MIC = aprox. $100X < MIC$ e que funciona como indutor de resposta SOS (Wagner & Hahn, 2004)). A concentração sub-MIC de Ciprofloxacina utilizada foi incapaz de impedir o cultivo de *E. coli* C600 e, como é sabidamente é indutora de resposta SOS, a falha de crescimento de isolados nesse meio foi presuntivamente atribuída à presença de fago lisogênico no isolado (Wagner & Hahn 2004). A confirmação de que cada um desses isolados contém, de fato, um fago lisogênico pode ser obtida num cultivo em meio TSA desse isolado (principalmente após irradiação UV, ou em presença de mitomicina C ou quinolônico) cruzado com cultivos de linhagens bacterianas sensíveis à infecção pelo fago. Resultados presuntivos indicam: 1) A concentração de enterobactérias presentes nas águas coletadas variou entre 10^2 e 1×10^4 UFC; 2) 53% das bactérias das colônias se mostram resistentes a Ampicilina; 3) Nas amostras analisadas havia fagos que permitiram a obtenção entre $5 \cdot 10^4$ - $2 \cdot 10^5$ UFPL (unidades formadoras de placas de lise); 4) presuntivamente, 57% das bactérias isoladas das águas continham fagos lisogênicos, sendo que dentre as bactérias Amp^R, 20% continham fagos lisogênicos.

Conclusão: As técnicas empregadas foram eficazes para detecção de fagos líticos e de bactérias resistentes aos antibióticos contendo fagos lisogênicos. Numa etapa posterior o ciclo lítico será induzido (RUV/agente químico) seguindo de cruzamento com bactérias sensíveis à infecção do fago.

Apoio Financeiro: FAPESP

HUMAN XP-V CELLS RESPONSE TO UVA-IRRADIATION IS AFFECTED BY MODULATION OF OXIDATIVE STRESS RESPONSES USING mRNA TRANSFECTION

Sodré, F. M. C.¹; Mancini, M. C. S.^{2,3}; da Silva, J. R.⁴; Pelegrin, G. F.¹; Ferreira, L. C. S.¹; Simanbuco, F. M.² and Menck, C. F. M.¹

¹ Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

² Multidisciplinary Laboratory of Food and Health (LabMAS), School of Applied Sciences (FCA), University of Campinas (UNICAMP), Limeira, SP, Brazil

³ Department of Biochemistry, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

⁴ Butantan Institute, Sao Paulo, SP, Brazil

Introdução e Objetivos: We aimed to use mRNA transfection strategy to study human cells' responses to ultraviolet A radiation (UVA) using fibroblasts derived from a Xeroderma Pigmentosum Variant (XP-V) patient, defective in translesion synthesis. The focus was to investigate the effects of oxidative stress on the UVA-irradiated cells. **Métodos e Resultados:** For that, we produced mRNA from the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) and Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) mRNAs, main proteins that control cells' defenses to oxidative stress. The efficient expression of both mRNAs was confirmed by western blott in A549 Keap1^{-/-} cells and PC3 cells – that express low levels of NRF2 – previously transfected with Keap1 and NRF2 mRNAs. Subsequently, XP-V complemented cells and XP-V cells were transfected with both mRNAs and UVA-irradiated (0 or 60 kJ/m²). Cells were kept for 72 h after irradiation in the presence or absence of ATR inhibitor and cell viability was estimated by XTT assay. Pilot experiments indicate that XP-V cells transfected with Keap1 mRNA were less viable after UVA irradiation than XP-V cells transfected with NRF2. Moreover, this pattern was kept when cells were treated with ATR inhibitor, but the cell viability was much lower. **Conclusões:** These results indicate that we are able to modulate the oxidative stress responses in human cells using mRNA of Keap1 (lowering cells' defenses) and NRF2 (increasing cells' defenses), and that XP-V cells resistance to UVA-irradiation is highly dependent on capacity to respond to oxidative stress.

Financial Support: FAPESP, CNPq and CAPES.

HETEROLOGOUS EXPRESSION, PURIFICATION, AND CRYSTALLIZATION OF DIHYDROFOLATE REDUCTASE FROM *Aspergillus fumigatus*

ANDRADE, Maria Aiza Fontes; DIAS, Marcio Vinícius Bertacine
Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences-USP

Introduction and Objectives: Chronic pulmonary aspergillosis (CPA) describes a group of progressively destructive lung infections caused by the inhalation of *Aspergillus* spp. conidia, mainly *Aspergillus fumigatus*. CPA has a prevalence of 1.5 million cases annually, with a mortality rate that can reach 80% within five years of infection if left untreated. Due to the severity of these infections, *A. fumigatus* is on the World Health Organization's list of critical priority pathogens for research and development of new drugs. A promising therapeutic target for the development of new antifungals is the enzyme dihydrofolate reductase (DHFR), which is essential for microbial metabolism and growth, as it plays a crucial role in the tetrahydrofolate biosynthesis pathway. However, the biochemical and structural characterization of the dihydrofolate reductase from *A. fumigatus* (AfDHFR) has not yet been conducted. Therefore, this study aims to achieve the heterologous expression, purification, and crystallization of AfDHFR. **Methods and Results:** BL21(DE3) competent *Escherichia coli* cells were transformed with pET28a-AfDHFR by heat shock. The transformed cells were grown in LB medium supplemented with 50 µg/mL kanamycin at 37°C with shaking until the OD₆₀₀ reached 0.5–0.7. Protein expression was induced by adding 0.2 mM IPTG and the culture was incubated with shaking for 20 h at 18°C. Afterward, the pellet was resuspended in buffer A (100 mM sodium chloride, 50 mM HEPES pH = 7.5) and disrupted by sonication. The protein was purified in two steps from the supernatant using a nickel-affinity IMAC column and a Superdex 16/600 200 pg column. For the crystallization, the protein was concentrated at 10 mg/mL and incubated with 2 mM NADPH in buffer A. All crystallization trials were performed by the sitting drop vapour-diffusion method using an Oryx4 robot and a variety of crystallization kits. After two steps of purification, approximately 5.2 mg of purified AfDHFR was obtained from one liter of culture, and SDS-PAGE analysis revealed a single band of about 29.8 kDa. It was observed that AfDHFR is stable, withstanding 7 days at 4°C with little degradation occurring. Protein crystals appeared after three days in multiple conditions containing PEG as a precipitant. **Conclusion and future perspectives:** Crystallization is the first step toward the structural characterization of AfDHFR. The biochemical and structural characterization of this enzyme will enable the discovery of more selective antifungals using the fragment-based drug discovery strategy.

Financial support: CAPES and CEPID B³.

Analysis of the HcZrt2 gene, a zinc responsive gene, in the survival of *Histoplasma capsulatum*

Jéssica Luana Chechi¹, Carolina Rodriguez Echeverri², Angela López³, Orville Hernández Ruiz^{2,3}, Ángel González Marín², Carlos Pelleschi Taborda¹

¹Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

²School of Microbiology, Universidad de Antioquia, Colombia

³Corporation of Biological Investigations, Colombia

Contact information: jessica.chechi@usp.br

Histoplasmosis is one of the most important systemic and endemic mycoses in the Americas and the world. The infection is acquired by inhalation of *Histoplasma capsulatum* propagules, such as microconidia and small mycelial fragments, mostly found in soil contaminated with droppings of certain bird species or bat guano. After inhalation, these propagules convert into yeasts in the lung. The disease may also develop through the reactivation of a quiescent focus of a past infection. *Histoplasma* spp. is an intracellular pathogen and yeasts are highly adapted to the host, using macrophages as a proliferative niche while avoiding the microbicidal mechanisms inside these cells. As a result, innate immune cells are unable to control *H. capsulatum* on their own. Within the intracellular compartment, yeast replication requires the acquisition of several essential nutrients, including metal ions. Studies show that, although iron and zinc are sufficiently abundant in resting macrophages, once these phagocytic cells are activated by pro-inflammatory cytokines causes restriction of these metals to yeast within macrophages as a form of nutritional immunity. Thus, the objective of this study is to elucidate and characterize genes involved in the acquisition of zinc metal for a better understanding of the mechanisms of virulence, survival, and intracellular replication of the fungal pathogen *H. capsulatum*. Expression analyzes of genes related to the acquisition of zinc (ZAP1, ZRC1, ZRC2, ZRT1 and ZRT2 genes) were performed. After analyzing the genes, previously reported in the databases of sequences and genomes of *H. capsulatum* and other related fungi, the gene ZRT2, associated with the acquisition of zinc was selected to obtain mutants of *H. capsulatum* using the CRISPR-Cas9 methodology. The design of guide RNAs for the ZRT2 gene was performed using CRISPOR software and inserted into the plasmid. *E. coli* were used for plasmid expansion and concentration. Then, *Agrobacterium tumefaciens* (LBA 1100 and AGL-1 strains) were electroporated to receive the plasmids and co-cultivation with *H. capsulatum* was performed. Under dilution conditions of 1:1 and 1:3 (bacteria: fungus) and a time of 48 hours, we achieved successful transformation. However, mixed transformed and non-transformed yeasts were present even in the selection medium. We are currently working with cocultivation of *A. tumefaciens* and *H. capsulatum* strains in higher hygromycin B concentrations to better select the transformed yeasts. Microscopic and bioinformatics analysis showed that mutant cells had distinct morphologies compared to wild-type yeasts, such as smaller and standard size, as well as absence of pseudohyphae.

Key words: *Histoplasma capsulatum*, zinc gene, ZRT2, CRISPR-Cas9.

FAPESP (Grants n° 2021/01904-7 and 2020/03607-7)

ANTIBODIES ARE ESSENTIAL TO COMPLEMENT ACTIVATION IN *SPOROTHRIX* INFECTION

Figueiredo, J.M., Taborda, C.P., Lopes-Bezerra, L.M., Aianianda, V.

Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences-USP

Introduction and Objectives: Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis in exponential growth in Brazil, due to the emergence of *Sporothrix brasiliensis*, a highly virulent zoonotic species. The cell wall model proposed for *S. brasiliensis* and *S. schenckii* reveals that a peptidorhamnomannan (PRM) component is present in the outermost fibrillar layers. PRM is a complex glycoconjugate bearing N- and O-glycosidically linked chains with several rhamnose epitopes. The PRM of *S. brasiliensis* has particular new structures distinct from *S. schenckii* and was shown to modulate the phagocytic activity of human macrophages via the CR3 receptor. Regarding complement system, it was already demonstrated that all pathways are activated by PRM, but the understanding of each pathway activation is still unknown. Therefore, the aim of this study was to dig into the role of each complement pathway – classical, alternative and lectin pathways – in order to discover if structural differences between PRMs and its O-linked fractions play a role in the complement activation patterns.

Methods and Results: PRMs and its enriched O-linked fractions were extracted from *S. brasiliensis* and *S. schenckii*, quantified by phenol-sulfuric method, lyophilized and diluted in stock concentrations. Checkerboard titration was carried out to find the optimal PRMs and O-linked fractions' concentrations for complement activation analysis. Then, ELISA assays were carried out using a final concentration of 0.5 µg/mL of each compound diluted in carbonate buffer 0.05M pH 9.6. After plates' blocking, tests were carried out by diluting whole human serum (wHS) in Gelatin Veronal Buffer (GVB) complete (+), with the addition of CaCl₂, and incomplete (-), with the addition of EGTA. Human sera C1q-depleted (C1q-depl), Mannose-binding-lectin-depleted (MBL-depl) and Ig-depleted (Ig-depl) were also diluted in GVB+ and incubated with the compounds. The production of C3b was determined by a sandwich ELISA using a monoclonal antibody anti-C3b. The results demonstrated that all the compounds are able to activate the three complement pathways. Interestingly, the assays with serum depleted in immunoglobulins (Ig-depl) led to the absence of complement activation regardless of the inducer compound used.

Conclusions: All complement pathways are activated by *S. schenckii* and *S. brasiliensis* PRMs and its O-linked enriched fractions. The exception is related to Ig absence in human serum, indicating that, although immunoglobulins are usually related to classical pathway, they seem to play another essential role in complement activation by *Sporothrix* cell wall carbohydrates. Our data report for the first time that immunoglobulins recognition is a crucial step for complement-mediated immune response towards *Sporothrix* spp infection.

This project was financially supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 – Process 88887.835471/2023-00.

DETERMINATION OF THE STRUCTURAL BASES FOR RESISTANCE TO ISONIAZID USING MISSENSE MUTATIONS IN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

ROSSINI, Nicolas de Oliveira¹, CHAVÉZ-PACHECO, Sair Máximo¹, LIBREROS-ZÚÑIGA, Gerardo Andrés^{1,2,3}, PORTELLI, Stephanie^{4,5}, DOS SANTOS, Jademilson Celestino¹, ASCHER, David^{4,5}, PIRES, Douglas Eduardo Valente^{4,5}, ROSA, Leonardo Talachia⁶, DIAS, Marcio Vinicius Bertacine^{1,2,7*}

¹ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brazil.

² Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, Brasil

³ Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Calle 4B 36-00. Santiago de Cali, Colombia.

⁴ Structural Biology and Bioinformatics, Baker Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Victoria, Australia

⁵ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bio21 Institute, University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia

⁶ Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas

⁷ Department of Chemistry, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, UK.

Introduction and objectives

Tuberculosis represents an important global health problem due to the emergence of multidrug-resistant and extremely-resistant strains, which reduces, even more, the number of available drugs for treatment. Among the most used drugs for tuberculosis treatment, Isoniazid (INH) is considered a first-line drug, and its target, the enzyme InhA, has a number of missense mutations that lead to resistance. Nonetheless, the molecular mechanism of resistance to INH is not fully understood. Therefore, we aim with this work to perform the biophysical, biochemical and structural characterization of InhA mutants I16T, I21T, I25T, I95P, I194T, A190S, D256N, I258T, I258V and Y259H identified in clinical *M. tuberculosis* strains resistant to isoniazid in order to understand the resistance mechanisms involved.

Methods and Results

Site-directed mutagenesis reactions were performed using the Stratagene QuickChange protocol using as a template a construction containing the InhA gene inserted into a pET28a-SUMO vector. Mutant InhA proteins were overexpressed, purified and co-crystallized in complex with NADH. To determine thermodynamic parameters, Isothermal Titration Calorimetry (ITC) runs were performed in a PEAQ-ITC microcalorimeter (GE Healthcare). InhA (50 μ M-100 μ M) was titrated with 25 successive injections of 1.4 μ L NADH (2mM - 7mM) at 25°C. Differential Scanning Fluorometry assays were performed using a real-time thermocycler (BioRad CFX connect) to determine the thermal stability of the proteins. The temperature ranged

from 25 to 95 °C. The experiment was set up in triplicates, the apoproteins and complexes with NADH and NAD⁺ thermal stabilities were tested. Until the present moment, we were able to obtain twelve new crystal structures of InhA mutants in complex with coenzyme NADH or the inhibitory adduct INH-NAD, carry out calorimetric studies using ITC in the presence of NADH, and also investigate the thermal unfolding of these proteins using DSF, providing important information about novel resistance mechanisms associated with this enzyme. For mutant I95P, it has been observed that this mutant lacks the interaction with the NADH co-factor, and therefore, SPA Cryo-EM has been used as an alternative to obtaining the crystal structure for this mutant, although the high flexibility of this particle has proven to be a challenge during data processing.

Conclusion

We selected and constructed ten missense mutations for InhA, including some that encompass coding regions different from those previously studied. We successfully study by structural biology or other biophysical techniques mutants I16T, I21T, I25T, I95P, A190S, I194T, D256N, I258T, I258V, Y259H. Most of these mutations cause a change in the water network of the NADH binding site of InhA, which could be observed by the introduction of one or more water molecules. This change causes a decrease in the affinity of NADH and possibly to NAD-INH, which alters the turnover of NADH or NAD-INH. However, a number of mutants have other mechanisms of resistance that are particularly different from those previously described in the literature. We could observe novel mechanisms that include the destabilization of quaternary structure and a possible difference of affinity between NADH and NAD-INH in favor of the coenzyme. Also, for mutant I95P, we are currently trying to obtain the structure for APO protein using SPA Cryo-EM.

Financial Support

FAPESP 2021/10577-0, 2021/14205-0, FAPESP 2022/12234-5, CAPES 88887.663073/2022-00

THE STRUCTURAL AND FUNCTIONAL BASIS OF GENB2 ISOMERASE ACTIVITY FROM GENTAMICIN BIOSYNTHESIS. de Oliveira, G.S.¹, Bury, P.S.¹, Huang, F.², Li, Y.³, Araújo, N.C.¹, Zhou, J.⁴, Sun, Y.³, Leeper, F.J.⁵, Leadlay, P.F.², Dias, M.V.B.¹. ¹Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Brazil. ²Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK. ³Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery (Ministry of Education), and School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, China. ⁴State Key Laboratory of Quantitative Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, China. ⁵Yusuf Hamied Department of Chemistry, University of Cambridge, UK.

Introduction and Objectives: Aminoglycosides are important antibiotics used to treat severe infections caused mainly by gram-negative bacteria. Gentamicin is an aminoglycoside, and despite its toxicity, is clinically used to treat several pulmonary and urinary infections. The commercial form of gentamicin is a mixture of five compounds with minor differences in the methylation of one of their aminosugars. In the case of two compounds, gentamicin C2 and C2a, the only difference is the stereochemistry of the methyl group attached to C-6'. GenB2 is the enzyme responsible for this epimerization and it is one of the four PLP-dependent enzymes encoded by the gentamicin biosynthetic gene cluster (BGC).

Methods and Results: We have determined the structure of GenB2 in its holo form in complex with PMP and also in the ternary complex with gentamicin X2 and G418, two substrate analogs by X-Ray Crystallography. Based on the structural analysis, we were able to identify the structural basis for the catalytic mechanism of this enzyme, which was also studied by site-directed mutagenesis. Unprecedentedly, GenB2 is a PLP-dependent enzyme from fold I, which is able to catalyze an epimerization, but with a distinct mechanism from fold III PLP-dependent epimerases, using a cysteine residue near the N-terminus. The substitution of this cysteine residue for serine or alanine completely abolished the epimerase function of the enzyme confirming its involvement.

Conclusion: This study not only contributes to the understanding of the enzymology of gentamicin biosynthesis but also provides valuable details for exploring the enzymatic production of new aminoglycoside derivatives.

Financial support: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grants numbers: 2010/15971-3, 2015/09188-8, 2018/00351-1, 2021/10577-0 and 2022/12234-5) to MVBD, the Funds for International Cooperation and Exchange of the National Natural Science Foundation of China (Grants numbers: 31920103001) to YS, the FAPESP fellowship to PSB and GSO (2014/07843-6 and 2017/23627-0, respectively). MVBD also received a research productivity fellowship from CNPq (208998/2020-0).

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE OlmO-OLIGOMYCIN COMPLEX: INSIGHTS INTO SPIROKETAL GROUP FORMATION IN POLYKETIDE BIOSYNTHESIS.

Sales, L.A.T.¹; Alves, B.K.¹; Bilyk, O.²; Leadlay, P.F.²; Dias, M.V.B.¹

¹ Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo-SP, Brazil.

² Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge CB2 1GA, United Kingdom.

INTRODUCTION: *Streptomyces* sp. has been widely studied by the pharmaceutical industry for its ability to produce compounds with biological activity, such as antibiotics and antitumor drugs. Among the metabolites biosynthesized by this bacterial group, some polyketides are produced by polyketide synthases (PKSs) and further modified by tailoring enzymes. Recently, these enzymes have garnered attention due to their unique characteristics and biotechnological potential in biocatalysis. Spirocyclases are a subset of these enzymes involved in the formation of spiroketal systems in polyketides. OlmO has been shown to exhibit spirocyclase activity and is implicated in the biosynthesis of oligomycin, an antibiotic with antitumoral properties. Although the structure of OlmO was recently determined by our research group, the complex with its substrate or product has remained elusive. **OBJECTIVES:** This study aims to perform a structural analysis of OlmO in complex with oligomycin to elucidate the product's binding mode and identify the residues involved in the catalytic mechanism of this unique enzyme. **METHODOLOGY:** The OlmO protein was expressed in BL21(DE3) competent cells. Purification was achieved through molecular exclusion chromatography using a HiLoad®16/600 Superdex 75 pg column, and protein purity was verified by 12% SDS-PAGE. Crystallization conditions were optimized using the JENA Bioscience crystallization kit. Data analysis was conducted using Phenix, Coot, and PyMOL software packages. **RESULTS:** OlmO was successfully purified using a buffer containing 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5. Co-crystals of the OlmO-oligomycin complex were obtained. X-ray diffraction data revealed that the crystals diffract to a resolution of 1.92Å. The crystals belong to the P65 space group with a dimer in the asymmetric unit. The structure was solved by molecular replacement, revealing residues involved in anchoring oligomycin, particularly Thr43 and Tyr95. Interestingly, Tyr95 is a conserved residue found in the catalytic domains of SchU2 and NigO, which are involved in the biosynthesis of calcimycin and nigericin, respectively. The presence of this conserved Tyr95 suggests a common evolutionary origin and functional mechanism among these enzymes. The spiroketal group is located near a catalytic triad formed by aspartic acid and lysine, as previously predicted. **CONCLUSION:** This structural study of the OlmO-oligomycin complex provides new insights into the mechanism of spiroketal group formation in oligomycin, offering potential for future biotechnological and pharmaceutical applications.

Keywords: Spirocyclases, Polyketides, Biosynthesis.

Funding: FAPESP (2021/01581-3); CEPID B3.

Title:

COLONIZATION OF THE INFANT ORAL MICROBIOME ACROSS SOCIOECONOMIC STATUS IN THE BRAZILIAN URBAN AMAZON: A LONGITUDINAL ANALYSIS DURING THE FIRST YEAR OF LIFE

Authors:

Quintas dos Santos, M.¹; Gruenwaldt, T. B.²; da Silva Lima, F.²; Cestonaro, T.²; da-Glória, P. J. T.⁶; Lee, J.⁴; Hale, V. L.⁵; Piperata, B. A.³; Hoffmann, C.^{1,2}.

1. Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo.
2. School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo.
3. Department of Anthropology, The Ohio State University.
4. College of Public Health, Division of Environmental Health Sciences, The Ohio State University.
5. Department of Veterinary Preventive Medicine, The Ohio State University.
6. Institute of Philosophy and Human Sciences - Federal University of Pará

Introduction and Objective:

The colonization of the human oral microbiota begins at birth, but little is known about its formation and maturation. Here, we investigated the influence of socioeconomic status (SES) on the infant oral microbiome during the first year of life.

Methods and Results:

Saliva samples were collected from 52 healthy, term-born Brazilian infants, in three measurement rounds during the first year of life. Households were stratified into quartiles according to the total income. The oral microbiome was analyzed using 16S rDNA sequencing to assess alpha and beta diversity and taxonomic relationships.

Infants' mean (standard deviation) ages in rounds 1, 2, and 3 were 29(8), 115(16), and 308(18) days, respectively. Beta diversity analysis showed a progressive microbiome shift across income levels (Weighted and Unweighted Unifrac, Permanova, $p=0.001$). Faith's phylogenetic diversity increased between rounds 1 and 2 solely in the lowest income quartile (Mann-Whitney, $p=0.017$). Infants from the highest-income households exhibited this increase only between rounds 2 and 3 (Mann-Whitney, $p=0.01$). Pielou Evenness showed a negative correlation with the infants' weight in round 2 (Spearman's $\rho = -0.3$, $p = 0.032$). Additionally, the weight, rather than the round, was responsible for altering the Pielou Evenness (Two-Factor ANOVA, $p=0.0148$). Oral microbiome taxonomic colonization was distinct between the lowest and highest income quartiles: *Rothia sp.* was observed as early as 30 days of life, and only in the lowest income group; *Alloprevotella* appeared from round 1 in the lowest income quartile, and from round 2 onwards on the other quartiles; *Schaalia odontolytica* was detected from the highest income quartile starting in round 2, and was present only in the third round for the other income quartiles.

Conclusions:

Household socio-economic status influences oral microbiome structure progression, with several taxa colonizing the oral cavity differently over time.

Funding:

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Finance Code 001.

U.S. National Science Foundation (NSF) Award Number: 1921592

DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A NEW ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FOR DENV VIRUS USING EDIII-BASED RECOMBINANT PROTEINS.

Pereira, S.S., Machado, R.R.G., Farias, J.P., Andreato, R.S., Rodrigues-Jesus, M.J., Fogaça, M.M.C., Souza, M.S., Martins, E.G., Romano, C.M., Durigon, E.L., Amorim, J.H., Ferreira, L.C.S. Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences-USP.

Introduction and objectives: Dengue virus (DENV) is the most significant arbovirus transmitted to humans. Serological tests are widely utilized for diagnose dengue infections. However, commercially available tests lack adequate sensitivity and specificity, especially in regions where DENV co-circulate with other Flavivirus, such as the Zika virus. Thus, the aim of this study was to produce recombinant DENVs 1-4 EDIII and evaluate it as solid-phase antigens in a dengue IgG ELISA test.

Methods and results: The recombinant DENV 1-4 EDIII proteins were constructed based on DENV Envelope proteins. The proteins were expressed in *Escherichia coli* and purified using affinity chromatography. After that, we evaluated the performance of the EDIII-based ELISA using 648 human serum samples with prior laboratory characterization. The applicability of the immunoassay was assessed using human serum samples from an endemic region of Brazil. The recombinant proteins were recovery at a high degree of purity and preserved antigenicity. Furthermore, the EDIII proteins did not exhibit cross-reactivity with anti-ZIKV antibodies of infected mice. The performance of the EDIII-based IgG ELISA test demonstrated high accuracy, with an area under the curve of 0.95, a cutoff value of 0.3 and an overall sensitivity of 87.8% and 91,4% specificity. The applicability of the ELISA in an endemic region showed that, among 318 serum samples of non-symptomatic persons, 65% of them reacted in the test. Moreover, 123 samples were reactive to a single DENV serotype, while 90 samples reacted to multiple serotypes. These results underscore the effectiveness of the recombinant proteins in specifically detecting DENV-serotypes and monitoring individuals exposed to multiple serotypes and severe dengue.

Conclusion: In this research, we produced the four DENV EDIII proteins that retained antigenicity and specificity of the native viral proteins. The proteins showed reduced cross-reactivity with anti-ZIKV antibodies. The DENV EDIII-based IgG ELISA demonstrated robust performance, combining sensitivity and specificity. Additionally, the ELISA was capable of monitoring serological responses in an arbovirus-endemic region, allowing for the detection of serotype-specific DENV infections. Overall, the results confirm the ELISA's accuracy in detecting past dengue infections, aiding public health strategies and dengue vaccination programs.

Funding information: The study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, grant numbers 88887.600175/2021-00 and 8888130782/2016-00.

ESTUDO DO GENE *AIM19* NA BIOGÊNESE MITOCONDRIAL EM *Saccharomyces cerevisiae*

Barbosa, A. P., Barros, M.H.

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos

A produção de ATP nas mitocôndrias depende da correta montagem da cadeia transportadora de elétrons. As proteínas que compõem esta cadeia são codificadas por genes nucleares e mitocondriais sob forte regulação traducional a fim de manter o controle estequiométrico de montagem. Fatores codificados pelo núcleo através da ação de (co)ativadores regulam a tradução mitocondrial. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o modelo de estudo da interação entre os produtos e genes nucleares e mitocondriais por ser um microrganismo anaeróbico facultativo, o que viabiliza o isolamento de mutantes respiratórios através do crescimento diferencial em meio seletivo com fontes de carbono não fermentáveis. Estudos anteriores descreveram o Complexo MIOREX (*Mitochondrial Organization of Gene Expression*) como um conjunto de fatores que funcionam como um interatoma relacionado à biogênese mitocondrial, envolvido no metabolismo do DNA mitocondrial, síntese proteica e degradação de RNA em leveduras. Análises *in silico* realizadas em nosso laboratório sugeriram diversas interações entre proteínas codificadas pelo DNA nuclear e o Complexo MIOREX, destacando-se o gene nuclear *AIM19* que revelou interações negativas com *MDM10*, *MDM35*, *FMT1* e *MRX6* e interações positivas com *MRX11*, *MRPL39* e *COQ4*. Isso pode sugerir que a atividade do produto deste gene possa estar relacionada à respiração celular. Assim, o objetivo deste projeto é caracterizar o produto do gene *AIM19*, de função desconhecida, através da pesquisa de localização intramitocondrial, caracterização bioquímica e de interação dos parceiros genéticos ou físicos deste.

Métodos e Resultados

AIM19 é um gene não essencial que codifica para uma proteína mitocondrial de função desconhecida, cujo mutante nulo apresenta maior aptidão competitiva em meio mínimo, meio rico e meio com uma fonte de carbono não fermentável, com diminuição da resistência ao estresse hiperosmótico e oxidativo. A superexpressão deste gene em nosso laboratório resultou na diminuição do crescimento tanto em YPGal (meio rico com galactose indutor do promotor *GAL10*) e em YPEG (meio rico não-fermentável com etanol e glicerol) a 30°C e 37°C, além da formação de grande quantidade de colônias com fenótipo “petite” relacionado a instabilidade do DNA mitocondrial. Os próximos passos do projeto visam a construção de alelos de *AIM19* fusionados a *tags*, localização intramitocondrial, avaliação do nível endógeno do produto de *AIM19*, avaliação do perfil de tradução mitocondrial de linhagens sob superexpressão de *AIM19*, caracterização fenotípica dos mutantes e estudo do seu interactoma genético e físico.

Conclusão

Os resultados preliminares em *S. cerevisiae* indicam que o produto do gene *AIM19* esteja relacionado à biogênese mitocondrial.

Apoio Financeiro: CAPES PROEX 88887.933243/2024-00

Título: Miltefosina em nanopartículas de alginato exibe atividade antifúngica em *Sporothrix brasiliensis*

Autores: Andriéli Bacega, Luciana Biagini Lopes, Kelly Ishida.

BACEGA, A.¹; LOPES, L. B.²; ISHIDA, K.¹

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP

²Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP

Introdução e Objetivos

Sporothrix brasiliensis é uma das espécies de fungos dimórficos de *Sporothrix* spp. causadores da esporotricose, uma micose que acomete a pele e o tecido subcutâneo, podendo disseminar-se por outros órgãos do corpo. *S. brasiliensis* pode ser encontrado em matéria orgânica na sua forma saprofítica ou na sua forma de levedura em hospedeiros mamíferos. A esporotricose é relatada principalmente em regiões tropicais e subtropicais, com casos distribuídos mundialmente. O Brasil destaca-se no número de casos, presente na maioria dos estados do país, tendo como centro epidemiológico a região sudeste. *S. brasiliensis* é predominantemente identificado em casos na América do Sul, sendo também a espécie mais virulenta. A primeira linha de tratamento é feita com itraconazol (ITZ); terbinafina (TRB) e iodeto de potássio (IP) são usados como tratamentos secundários ou combinados, e em casos refratários ou graves da doença é feito o uso de anfotericina B (AMB). Estudos já evidenciaram o potencial antifúngico *in vitro* da miltefosina (MFS), droga utilizada no tratamento oncológico de mama e da leishmaniose, contra cepas de *S. brasiliensis*, apresentando uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 1 e 2 µg/mL. A falta de opções de tratamento, a resistência fúngica e a toxicidade levam a necessidade de buscar por novas estratégias de tratamento para o controle da esporotricose. O uso de nanocarreadores poliméricos vem sendo aplicado na indústria farmacêutica a fim de otimizar diversos aspectos do fármaco. O alginato (AN) é um dos polímeros mais utilizados para aplicação em *drug delivery*, possuindo características importantes para essa aplicação, como a biodegradabilidade, não toxicidade, não imunogenicidade, biocompatibilidade, propriedades mucoadesivas e baixo custo. O objetivo principal deste trabalho é determinar a CIM da MFS livre e incorporada em P80-MFS-AN sobre *S. brasiliensis in vitro*.

Métodos e Resultados

Neste trabalho, nanopartículas de alginato carregadas com miltefosina (P80-MFS-AN) foram testadas quanto ao seu potencial antifúngico contra três cepas de *S. brasiliensis* por microdiluição em caldo (protocolo EUCAST) e comparando-as à MFS livre e aos demais resultados de antifúngicos padrão aplicados no tratamento da esporotricose sobre três isolados clínicos de *S. brasiliensis*. Os fármacos padrão ITZ e TRB mostraram efeito fungistático com valores de CIM 1-4 µg/mL e 0,125-0,5 µg/mL, respectivamente. AMB teve valores de CIM entre 0,5-1 µg/mL e a MFS livre entre 1-2 µg/mL, sendo ambos fungicidas. P80-MFS-AN demonstrou valores de CIM e efeito fungistático entre 50-200 µg/mL, isso porque as nanopartículas promovem a liberação sustentada da MFS.

Conclusões

A P80-MFS-AN se mostrou capaz de inibir as cepas de *S. brasiliensis in vitro*, tornando-a uma opção terapêutica em potencial contra a esporotricose humana e felina.

Apoio Financeiro: CAPES, CNPq e FAPESP.

SYSTEMS BIOLOGY OF NEUROPATHOGENESIS OF YELLOW FEVER INFECTION

Pereira, B.B.S¹, Cunha, M.P.², Pour, S.Z.¹, Braconi, C.T.³, Duarte-Neto, A.N.⁴, Zanotto, P.M.A¹

1. Laboratory of Molecular Evolution and Bioinformatics, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.
2. Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil.
3. Department of Microbiology Immunology and Parasitology, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.
4. Pathology Department, Clinical Hospital, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

INTRODUCTION AND OBJECTIVES. The Yellow Fever (YF) disease is caused by the Yellow Fever Virus (YFV), a viral agent transmitted to vertebrate hosts by the bite of hematophagous mosquitoes carrying the virus. The pathogenesis of the disease can be divided into two distinct patterns of infection: (i) viscerotropic, and (ii) neurotropic. In Brazil, according to the Ministry of Health, from July 2017 to June 2018, 555 human cases were confirmed, and 203 lethal cases, in the state of São Paulo. Of these, 85 cases were followed up by the Department of Pathology at the Faculty of Medicine, University of São Paulo, and by the Laboratory of Molecular Evolution and Bioinformatics (ICB/USP), with autopsies being carried out on all patients and tissue collections for molecular investigation, to verify the presence of the virus in the brain, and also in other tissues. Here, we present new scientific research on the study of biological aspects related to accessibility, neuroinvasiveness and differential responses associated with different types of yellow fever virus (YFV-17DD and YFV-sylvatic), using molecular, pathological and differential gene expression obtained by RNAseq technique. **METHODS AND RESULTS.** To achieve the proposed objectives, RNAseq was performed on 13 samples of brain tissue, obtained from 10 patients who died with suspected yellow fever, and 3 patients who considered as control group. The groups were classified as sylvatic YFV with virus detected in the brain, sylvatic YFV without viral detection in the brain, vaccine YFV with virus detected in the brain and, vaccine YFV without viral detection in the brain. Gene expression levels in each group were analyzed to elucidate the neuropathogenesis of YFV, seeking to understand the neuroinvasiveness and neuroinfection of different strains. It is still unclear in the literature whether the neurological syndromes associated with YFV are due to direct YFV infection of brain cells, or are secondary to immunomodulatory phenomena. **CONCLUSION.** As a conclusion of our findings, it was possible to hypothesize that: (i) YFV viral particles crossed the BBB and reached the brain leading to neurological damage; (ii) the YFV particles reached the BBB, infected the endothelial cells, but did not go beyond it to reach the brain and; (iii) YFV viral particles do not reach the CNS and neurological damage is most-likely a secondary effect of the systemic infection. **FINANCIAL SUPPORT:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (projeto #441105/2016-5), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (projeto #2017/23281-6).

Pós-doc: Anita Brito

Orientadora: Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Departamento: Microbiologia

BRITO, A. **Epidemiologia e Prevalência do TEA no Brasil**. [Epidemiology and prevalence of ASD in Brazil]. 2024. Projeto de Pós-Doutorado Júnior (PDJ) - Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2024.

Os Transtornos do Espectro do Autismo (TEA) são condições complexas de neurodesenvolvimento, frequentemente acompanhados de comorbidades, caracterizadas por dificuldades na comunicação e interação social, associados a comportamentos restritos e repetitivos. O TEA é um transtorno multifatorial, em que fatores genéticos e ambientais estão envolvidos em um continuum. Estudos recentes indicam uma prevalência de 1 em cada 36 crianças nos Estados Unidos (2.78%) diagnosticadas com TEA, enquanto a OMS estima que 1 em cada 100 pessoas (1% da população mundial) esteja no espectro. Estudos epidemiológicos e de prevalência do TEA ainda são escassos no Brasil, o que faz com que usemos a prevalência de estudos dos Estados Unidos. Este projeto busca mensurar o TEA na população brasileira. Para tanto, pedimos a professores e cuidadores de creches, na cidade de Campina do Monte Alegre-SP, que indicassem crianças que tivessem sinais de TEA, resultando na avaliação de 108 crianças por uma equipe multiprofissional liderada por nosso grupo. Das 108 avaliações, 55 novos casos foram diagnosticados, somando-se aos 16 casos já diagnosticados previamente na cidade, resultando em 69 casos no total (1,19% da população local). A distribuição de gênero foi 55% de meninos e 45% de meninas (1.22:1, respectivamente), diferindo da proporção comum de 4:1 reportada em estudos anteriores.

Palavras chave: Autismo, Epidemiologia, Prevalência, TEA, Transtorno do Espectro do Autismo

ABSTRACT

BRITO, A.. **Epidemiology and prevalence of ASD in Brazil** [Epidemiologia e Prevalência do TEA no Brasil]. 2024. Post-Doc Project (PDJ) - Instituto de Ciências Biomédicas (ICB II), University of São Paulo, São Paulo, 2024.

Autism Spectrum Disorders (ASD) are complex neurodevelopmental conditions, often accompanied by comorbidities, characterized by difficulties in communication and social interaction, as well as restricted and repetitive behaviors. ASD is a multifactorial disorder involving genetic and environmental factors on a continuum. Recent studies indicate a prevalence of 1 in 36 children (2.78%) in the United States, while the WHO estimates 1 in 100 people (1% of the global population) are on the spectrum. Epidemiological studies on ASD prevalence are still scarce in Brazil, leading to reliance on U.S. data. This project aims to measure ASD prevalence in the Brazilian population. We asked teachers and caregivers in Campina do Monte Alegre-SP to identify children with signs of ASD, resulting in the assessment of 108 children by a multidisciplinary team. Of these, 55 new cases were diagnosed, adding to the 16 previously known cases in the city, resulting in a total of 69 cases (1.19% of the local population). The gender distribution was 55% boys and 45% girls (1.22:1), differing from the commonly reported 4:1 ratio in previous studies.

Keywords: Autism, Epidemiology, Prevalence, ASD, Autism Spectrum Disorder

Family of YcgR homologs that binds c-di-GMP in *Leptospirales*

Aline Biazola Visnardi^{1§}, Rodolfo Alvarenga Ribeiro¹, Anacleto Silva de Souza¹, Tania Geraldine Churasacari Vences², Edgar E. Llontop³, Anielle Salviano de Almeida Ferrari¹, Gabriela Roberto Silva¹, Chuck Shaker Farah³, Rogerio Corte Sassonia⁴, Roberto K. Salinas³, Cristiane Rodrigues Guzzo^{1*}, Robson Francisco de Souza^{1*}

¹ Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

² Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

³ Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴ Federal University of São Paulo, Department of Chemistry, São Paulo, Brazil.

The Leptospiraceae family, housing the genera *Leptospira*, *Leptonema*, and *Turneriella* within the Spirochaetales order, is a diverse group characterized by the presence of spirochetes, particularly the versatile *Leptospira* spp.. These spirochetes, with both saprophytic and pathogenic strains, exhibit adaptability to various environments. Analysis of the genome of *L. interrogans* whose species is pathogenic showed the presence of proteins containing PilZ domains, whose expression has already been confirmed by proteomics and may play an important role in spirochete biology. The PilZ domain proteins have the potential to bind to the second messenger cyclic diguanylate monophosphate (c-di-GMP), a key regulator of various cellular processes, including biofilm formation, motility, and virulence factors. The aim of this study is to investigate, through structural and biochemical methods, whether PilZ domains of *L. interrogans* retained the ability to bind c-di-GMP. At first, we started with the cloning of the gene with locus_tag LIC_11920, in an expression vector, in which the gene is fused to a 6×His tag in its N-terminal portion. The gene was expressed in *E. coli* BL21(DE3)-RIL cells and purified using chromatograph techniques. We evaluate the ability of this protein to dimerize by SEC-MALS (Size Exclusion Chromatography – Multiple Angle Light Scattering) assays to determine its experimental molecular mass. To test the affinity of the protein for c-di-GMP we perform ITC. As a result, we can state that LIC_11920 is a monomeric protein in solution, and analyses from ITC showed that LIC_11920 shows high affinity for c-di-GMP. To expand the analysis, we also intend to study the paralogs of this protein containing the same domain architecture: LIC_10049, LIC_12723, LIC_12994, and LIC_14002.

EXPRESSION AND CRYSTALLIZATION OF APRK, A KEY ENZYME FROM APRAMYCIN BIOSYNTHESIS.

Autors: Guilherme Henrique Aparecido de Oliveira, Márcio Vinícius Bertacine Dias.

OLIVEIRA, G. H. A.¹; Dias, M. V. B.¹

¹Departamento de microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction and objective

Aminoglycosides are one of the groups of bioactive molecules isolated from *Actinobacteria*. They are antibiotics rich in amino and hydroxyl groups, which are intrinsic to their action. The mechanism of action of aminoglycosides consists of the interaction of the amine groups contained in their amino sugars, which have a positive charge, with the ribosomal RNA of bacteria, which in turn has a negative charge. The binding occurs specifically at the A binding site of the 30S portion of the bacterial ribosome, leading to incorrect reading of the ribosomal RNA and consequently to the production of truncated proteins or proteins with incorrect sequences. Apramycin is a peculiar aminoglycoside due to its unique chemical structure, as it is insensitive to most aminoglycoside resistance mechanisms, especially by aminoglycoside-modifying enzymes, due to the octose ring contained in its core. AprK is one of the enzymes involved in the biosynthesis of apramycin, and its role is to catalyze a reaction in which a nucleotidyl group is transferred to a glucose molecule, resulting in the formation of NDP- β -D-glucose. Most of the enzymes involved in apramycin do not have yet any 3D structure. One of the way to obtain crystal structures is use crystallography, which is the most commonly applied way of solving protein structures; around 90% of the structures deposited in databases have been solved using this methodology.

Methods and results

Competent *Escherichia coli* pGro7 strains were transformed, receiving a plasmid containing the AprK coding sequence. The *E. coli* were grown in LB medium with kanamycin at 37°C until they reached an optical density of 0.600, where they were then induced with 100 mM IPTG and grown at 18°C for 16 hours. They were then lysed by sonication and AprK purified by metal ion affinity chromatography and then a second purification by molecular exclusion to ensure high purity. AprK was concentrated by centrifugation through a filter until it reached a concentration of 10 mg/mL, which was measured in a Biodrop. Finally, AprK was exposed to 6 96-well plates containing different crystallization conditions, where 30 μ L of the protein was used per condition. The AprK crystallized after 4 days in a specific condition. The concentration of AprK in recent articles presented difficulties due to the precipitation of the protein in the concentration, so there was a switch to working with truncated AprK. However, in this work the protein was worked on and concentrated in its complete form, which is attributed to the pGro7 strain expressing chaperones for better protein folding.

Conclusions

AprK's three-dimensional structure has not been resolved and successful expression and crystallization are crucial steps for subsequent diffraction and resolution of this structure.

Financial support

CAPES, FAPESP, CEPID B3

FATORES ASSOCIADOS AOS DESFECHOS DESFAVORÁVEIS AO TRATAMENTO DA TUBERCULOSE EM PESSOAS DO SEXO FEMININO NO ESTADO DE SÃO PAULO ANÁLISE RETROSPECTIVA (2016-2022)

Silva, V.O., Bispo, A.B. , Ramos, E.M. , Rosa, C.D. , Guimarães, A.M.S. Laboratório de Pesquisa Aplicada à Micobactérias (LaPam), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil

Introdução e Objetivos: O controle da tuberculose (TB) é uma questão de gênero frequentemente negligenciada, abrangendo diferenças fisiológicas e fatores sociais, econômicos e culturais. A TB afeta mais as pessoas do sexo feminino, devido a posições sociais inferiores, resultando em desfechos desfavoráveis (DDs) no tratamento. Partindo deste contexto, este estudo avaliou fatores associados a tratamentos malsucedidos de TB em pessoas do sexo feminino adultas (>18 anos) no Estado de São Paulo de 2016 a 2022. **Métodos e Resultados:** Realizou-se uma análise retrospectiva com dados do Sistema de Controle de Pacientes com TB do Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac. A variável principal foi o desfecho, considerando apenas dados completos. Os DDs foram definidos como abandono, óbito por TB, falência ou resistência medicamentosa, enquanto desfechos favoráveis foram definidos como cura. Modelos de regressão logística múltipla estimaram a associação entre desfechos e variáveis demográficas. Análises estatísticas foram feitas no software STATA versão 14 e os dados apresentados como razão de chances ajustada (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Entre 2016 e 2022, foram notificados 32.118 casos de TB (22% do total) em pessoas do sexo feminino adultas (84% < 60 anos). Informações sobre o desfecho estavam disponíveis para 31.159 casos (3% de dados faltantes). Após tratamento, 23.178 (74%) foram curadas, 11% (3.473 casos) foram transferidas ou mudaram de tratamento e 15% apresentaram DDs, incluindo abandono (74%), óbito por TB (21%) e falência ou resistência medicamentosa (5%). Fatores associados a DDs incluíram uso de drogas ilícitas (OR = 3.60; IC 3.19-4.05), falta de residência fixa (2.46; 2.04-2.97), desemprego (1.50; 1.35-1.67), raça/cor não-branca (1.34; 1.24-1.46), consumo de álcool (1.32; 1.15-1.51), tratamento autoadministrado (1.38; 1.25-1.52) e tabagismo (1.20; 1.08-1.33). Pessoas do sexo feminino sem residência fixa e usuárias de drogas tinham maior probabilidade de abandono (2.65; 2.07-3.38 e 4.16; 3.61-4.81, respectivamente). Recidiva de caso e diabetes foram associados à resistência ou falha medicamentosa (2.79; 1.77-4.40 e 1.83; 1.10-3.05, respectivamente). Óbitos foram associados à falta de residência fixa e ao consumo de álcool (2.06; 1.06-4.01 e 3.01; 2.06-4.39, respectivamente). **Conclusão:** O tratamento malsucedido foi associado a fatores socioeconômicos e comportamentais, indicando a necessidade de estratégias diferenciadas. A falta de discriminação de gênero cis ou trans no banco de dados não possibilitou a análise por categorias de gênero. Sendo assim, uma abordagem de controle da TB baseada em gênero é essencial para entender as desigualdades estruturais que contribuem para o risco e mortalidade.

Apoio Financeiro: As bolsas DTI foram fornecidas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (processo CNPq: 445745/2023-1). O programa de pós-graduação foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, 001). Este trabalho foi financiado pela FAPESP (2016/26108-0, 2020/07251-2).

Comitê de Ética: Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Plataforma Brasil, CAAE: 58878322.1.0000.5467, avaliação do IRB: 5.503.787).

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EBSELEN CONTRA *Cryptococcus gattii* E SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA

Letícia Serafim da Costa¹, Kelly Ishida¹

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

A criptococose é uma infecção fúngica invasiva causada por leveduras encapsuladas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, que podem causar manifestação pulmonar e/ou meningite. Ambas as espécies compartilham importantes fatores de virulência, como cápsula polissacarídica, células titãs e produção de melanina, mas a espécie *C. gattii* apresenta fatores adicionais para evadir do sistema imunológico do hospedeiro e estabelecer a infecção em pacientes saudáveis. Estas características podem contribuir para a falha da terapia medicamentosa, além da resistência e alta toxicidade dos antifúngicos. Diante desses fatos, a necessidade de busca e prospecção de novas moléculas com potencial antifúngico torna-se uma prioridade. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a ação do Ebselen (EBS) contra *C. gattii* e seus fatores de virulência. Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de EBS, a técnica de microdiluição em caldo foi realizada na cepa *C. gattii* R265 e em isolados clínicos (n = 8) e em morfotipos induzidos *in vitro*, como leveduras com cápsula aumentada e células titã. Foram realizados morfometria da cápsula e diâmetro das leveduras, determinação da permeabilidade capsular e ensaio de melanização. A curva do tempo de morte foi realizada após exposição ao EBS e à anfotericina B (AMB) em diversas concentrações. As cepas de *C. gattii* foram inibidas pela AMB quanto pelo EBS em baixas concentrações (0,03–2 µg/ml), levando à morte celular nas 2 horas iniciais de tratamento. A espessura capsular reduzida e a maior permeabilidade capsular foram observadas após o tratamento com EBS. Por fim, a produção de melanina foi totalmente inibida nas células de *C. gattii* tratadas com EBS. Juntos, estes dados destacam o potencial antifúngico do EBS contra cepas de *C. gattii*, sugerindo o EBS como uma molécula promissora a ser explorada e aprimorada em mais estudos *in vitro* e em modelos animais de infecção.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código de financiamento 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 306041/2022-7), FAPESP (auxílio a pesquisa, 2018/13877-1) e FAPESP (bolsa de doutorado, 2023/13608-9).

CHARACTERIZATION AND BIOLOGIC ACTIVITY OF *MRX3* AND *FMP10* IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* MITOCHONDRIA

Mesa, M., Barros, M.H.

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas da USP

Introduction and Objectives

MRX3 and *FMP10* are inferably paralogous nuclear genes in *Saccharomyces cerevisiae* encoding mitochondrial proteins of unknown function that were found associated with the MIOREX complexes and mitochondrial cristae junctions.

The initial goal is to analyze data from previous high throughput works and the predicted structure for Mrx3p and Fmp10p to formulate hypotheses about their function. Then, we are interested in identifying phenotypes associated with these genes. Besides the null mutants $\Delta mrx3$ and $\Delta fmp10$, we are looking for the effects of over-expressing these genes with different constitutive and regulated promoters and we are also interested in identifying genetic interactions that might help to elucidate their function.

Methods and Results

Bioinformatic analyses were performed using Saccharomyes Genome Database, The Cell Map, Alphafold, Foldseek, UniProt, EVcouplings and Y3K Project. The strains utilized are W303-1B and its derived mutants. Gene knockouts are generated by the one-step gene disruption technique. To detect Mrx3p and Fmp10p, the FLAG and HA tags are included in the recombinant genes *MRX3*-FLAG and *FMP10*-HA, respectively. Growth tests are made initially through serial dilution.

Both $\Delta mrx3$ and $\Delta fmp10$ mutants accumulate phosphatidic acid according to Y3K Project. Through computational prediction, Mrx3p and Fmp10p have a thioesterase domain with the hotdog fold and a motif resembling the HGG...D...T motif found in the active site of mitochondrial thioesterases previously studied *in vitro* such as Them4 and Them5. Given the putative catalytic motif, we propose that aspartate 159 and glutamate 160 are the main catalytic residues in Mrx3p and Fmp10p respectively.

We generated mutants that overexpress *FMP10*-HA by constructing the recombinant gene with the regulated *GAL* promoter. We observed that the *GAL-FMP10*-HA mutant has a significative growth defect with high frequency of *petite* colonies when the cells are cultivated in media with galactose, whereas the *GAL-fmp10*^{E160A}-HA point mutant can grow on galactose, although slightly slower when compared to the wild-type strain. This result indicates that the toxicity of *FMP10* overexpression might depend on the putative catalytic glutamate 160, albeit the excess of Fmp10p^{E160A} may still be causing some effect that does not involve the active site, given the slower growth on galactose for this point mutant, which is more pronounced at 37°C. A similar approach for *MRX3* shall be of paramount importance.

Conclusions

MRX3 and *FMP10* encode putative thioesterases with a conserved catalytic motif within the hotdog fold. Mrx3p and Fmp10p may be related to phospholipid metabolism in mitochondria.

Since *MRX3* and *FMP10* remain uncharacterized, more experimental approaches are needed.

CLONAGEM EM ORGANISMOS HETERÓLOGOS PARA EXPRESSÃO DE LANTIBIÓTICOS PRESENTES EM *STREPTOMYCES*

Zanetti, M. C. G., Maldonado, G. P., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos

O gênero de bactérias *Streptomyces*, pertencente ao filo Actinobacteria, é conhecido pelo seu elevado potencial metabólico, sendo um dos principais produtores de moléculas antibióticas. Entretanto, devido ao fenômeno de surgimento de patógenos multi-resistentes, há a necessidade de estudo de linhagens de ambientes inexplorados produtoras de novos compostos, os quais não devem propiciar uma subsequente resistência. Portanto, tem-se os lantibióticos como uma alternativa viável, uma vez que ainda são mais vulneráveis a alterações genéticas. Ou seja, mesmo que um dos principais impedimentos dos estudos da produção de metabólitos secundários em *Streptomyces* seja o cultivo e a expressão dos *clusters* biossintéticos em condições laboratoriais, a clonagem em organismos heterólogos permite que tais análises tornem-se factíveis. Logo, esse projeto tem como objetivo, fazendo uso da técnica de clonagem *In-Fusion*, expressar o cluster biossintético de lantibiótico presente na *Streptomyces* NBS 14/10, com o propósito de analisar suas propriedades antimicrobianas.

Métodos e Resultados

A princípio, foi realizada uma análise do genoma já fragmentado pela plataforma *antiSMASH*, a fim de visualizar o tamanho e os genes componentes de cada *cluster* biossintético de lantibiótico da bactéria. Assim, dentre os 4 *clusters* identificados foi escolhido o 1.19, o qual apresentou alta similaridade com o BGC presente em *S. bingchenggensis*. Essa escolha foi feita por seu produto não ser caracterizado e ser classificado como pertencente à família SCO0268, a qual possui apenas um peptídeo identificado *in silico* em *S. coelicolor*. Logo, foi necessária a seleção dos genes que participassem da biossíntese do lantibiótico, sendo feita uma delimitação gênica por meio da análise de vizinhança genômica gerada pelo site *Enzyme Function Initiative* (EFI). Então, foi possível passar para o desenho dos primers com o aplicativo *Geneious* de acordo com o protocolo da técnica de clonagem *In-Fusion* e com a separação do *cluster* biossintético em 4 fragmentos de aproximadamente 4Kb. Por fim, foi possível a amplificação por PCR desses fragmentos no tamanho esperado.

Conclusão

Portanto, conclui-se que o projeto apresenta resultados promissores e que indicam o sucesso da transformação bacteriana a ser realizada; uma vez que as etapas seguintes se resumem ao processo de montagem e inserção do vetor de clonagem, e à expressão heteróloga do lantibiótico. Nessa perspectiva, o objetivo geral poderá ser alcançado, gerando uma ótima complementação ao que pouco se sabe sobre a atividade antimicrobiana desse *cluster* biossintético escolhido e às alternativas no combate contra patógenos multi-resistentes.

Apoio financeiro

Este projeto foi apoiado pela bolsa PIBIC-CNPq.

Título: PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS DE PLANTAS NATIVAS BRASILEIRAS SOBRE *Candida auris*.

Autores: Moure H.S.¹; de Ferrari M.V.B.¹; Carvalho, J.C.S.²; Tamayose, C.I.²; Ferreira, M.J.P.²; Sannomiya, M.³; Ishida, K.¹.

¹ Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; ² Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; ³ Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Introdução e objetivo: *Candida auris* foi classificada em 2022 pela OMS um dos patógenos fúngicos de prioridade crítica para pesquisa, no mesmo nível de *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, principalmente devido ao seu perfil de resistência a fármacos, alta mortalidade e rápida disseminação global. Com a emergência de microrganismos multirresistentes, novas opções de tratamento e desinfecção se fazem necessárias. Neste estudo, fizemos uma triagem de extratos vegetais (n=79) e alguns de seus compostos isolados (n=26), obtidos de espécies nativas brasileiras das famílias Asteraceae, Bignoniaceae e Malpighiaceae contra patógenos fúngicos. **Métodos e Resultados:** Através do ensaio de microdiluição em caldo, trinta e oito extratos ou frações exibiram ação anti-*C. auris* (2-128 µg/mL) assim como para outras leveduras (*C. albicans* e *C. neoformans*), mas nenhum exibiu ação sobre *A. fumigatus* ou *Fusarium solani*. Notavelmente, o isolado de *C. auris* do clado II foi mais suscetível enquanto isolados dos cladros I e IV mostraram maior tolerância. Os extratos mais ativos, com inibição em concentrações inferiores a 64 µg/mL para ao menos uma espécie, foram as frações n-butanol de *Moquiniastrum oligocephalum* e acetato de etila de *Baccharis oblongifolia* e o extrato metanólico de *Byrsonima fagifolia*. Este último, junto de seus compostos isolados derivados do ácido galoilquínico, demonstraram a melhor atividade antifúngica sobre *C. auris* (1-32 µg/mL). **Conclusão:** O gênero *Byrsonima* e os derivados galoilquínicos já são descritos na literatura com ação sobre *C. albicans* e *C. neoformans*, e nesta pesquisa, descrevemos o extrato de *Byrsonima fagifolia* e os derivados galoilquínicos como importantes candidatos para futuros estudos como antifúngicos com ação anti-*Candida auris*.

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 306041/2022-7), e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2023/12190-0 e 2023/12793-7).

Título: Efeito da filastatina, farnesol e tirosol na adesão e em genes de virulência de *Candida tropicalis*

Autores: Murilo Moreira dos Santos¹; Kelly Ishida¹.

Instituição: ¹Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia (Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Edifício II, Lab. 150, 1º Andar, CEP: 05508900 - São Paulo, SP - Brasil).

Resumo: O cenário epidemiológico das infecções causadas por *Candida* spp. vem se tornando mais crítico nos últimos anos devido ao aumento da resistência antifúngica e mudança epidemiológica de algumas espécies. Nas últimas décadas, a ascensão de espécies de *Candida* não-*Candida albicans* (CNCA) tem sido um problema, na qual *Candida tropicalis* é uma das protagonistas. Portanto, este cenário aliado a um limitado arsenal terapêutico nos direciona para a necessidade da descoberta de novas moléculas com potencial antifúngico. A investigação da ação da filastatina (FLS), farnesol (FAR) e tirosol (TIR) no fenótipo da adesão e em genes de virulência tem como objetivo explorar e entender a regulação da adesão e de fatores de virulência em *C. tropicalis*. Para isso, foi realizado um ensaio antiadesão em microplacas de poliestireno e expressão gênica dos seguintes genes de virulência por RT-qPCR na presença das moléculas: *BCR1*, *EFG1*, *SAP3*, *NGT1*, *ALS1*, *ALS3*, *ERG11*, *WOR1*, *CDR1* e *HWP1*. As concentrações das moléculas FLS, FAR e TIR utilizadas nestes ensaios se basearam em informações da literatura, onde há descrição da ação antivirulência em 50 µM para FLS, 3 mM para FAR e 20 mM para TIR. Todas as três moléculas diminuíram a adesão de *C. tropicalis* para todas as cepas (N = 6). Em números absolutos, a cepa IAL-01 foi a que apresentou maior média de células aderidas (1155,75±117,53), e também a maior porcentagem de inibição da adesão pela ação da FLS (75%), FAR (51,8%) e TIR (39%). Na expressão gênica, sob efeito da FLS, apenas *CDR1* teve expressão aumentada e todos os outros genes (*BCR1*, *EFG1*, *SAP3*, *NGT1*, *ALS1*, *ERG11*, *ALS3*, *WOR1* e *HWP1*) foram regulados negativamente, destacando o gene *BCR1* diminuído em 4 vezes e *EFG1*, *ALS1* e *ALS3* diminuídos em cerca de 2 vezes. Para FAR, todos os genes foram regulados negativamente, destacando *BCR1*, diminuído em cerca de 6 vezes. Quanto ao TIR, houve aumento na expressão de *BCR1*, *SAP3*, *NGT1* e *HWP1* em cerca de 1 vez, além de diminuição na expressão de *EFG1*, *ALS1*, *ERG11*, *ALS3*, *WOR1*, e *CDR1*, destacando *ALS1* e *ALS3* reduzidos em cerca de 2,5 vezes. O ensaio *in vitro* antiadesão é corroborado pela regulação negativa dos genes de adesão na RT-qPCR, além disso, outros genes de virulência responderam negativamente aos tratamentos, evidenciando o caráter promissor das moléculas no cenário anti-*Candida*.

Apoio financeiro: FAPESP: 2022/08516-5 e 2023/012190-0; CAPES: 001 - 88887.663125/2022-00) e CNPq: 306041/2022-7.

EFEITOS DA INFECÇÃO *IN VITRO* POR SARS-COV-2 EM NEURÔNIOS CORTICAIS E CÉLULAS PROGENITORAS NEURAIS

Oliveira, N.C., Beltrão-Braga, P.C.B., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos

A infecção por SARS-CoV-2 em humanos pode causar diversos sintomas neurológicos, como confusão mental, ageusia, ataxia, convulsões, encefalite e anosmia ^{1,2}. Além desses sintomas agudos, há relatos de déficits nas funções cognitivas e alterações na consciência que persistem por mais de seis meses ³. Esses sinais clínicos, juntamente com a detecção do vírus em tecidos pós-morte ¹, indicam o neurotropismo do coronavírus. Estudos *in vitro* mostram que a infecção por SARS-CoV-2 em células neurais pode provocar inflamação e apoptose ⁴. As observações clínicas também sugerem que a infecção pode aumentar a excitotoxicidade glutamatérgica ⁵. Este trabalho visa investigar e comparar o perfil de infecção e os efeitos citopáticos do SARS-CoV-2 em células progenitoras neurais (NPC) e neurônios corticais (NC) derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC).

Métodos e Resultados

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEP: 4.144.470). As iPSCs de pacientes neurotípicos foram obtidas do biobanco do "Projeto A Fada do Dente" (CAAE: 58219416.0.0000.5467). A produção de NPC e os NC e a infecção por SARS-CoV-2 (MT350282.1) com MOI 0,5 seguiu o protocolo estabelecido anteriormente ⁶. Os resultados foram obtidos utilizando ensaios para avaliar a mortalidade celular, inflamação e atividade sináptica, através das técnicas de RT-qPCR, imunofluorescência, espectrofotometria e Luminex xMAP.

A infecção por SARS-CoV-2 tanto em NPC quanto em NC, leva à morte celular, acompanhada de um aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras. Ambas as células são suscetíveis ao vírus, mas não são permissivas, portanto não permitindo a replicação viral. Nos NC, além dos efeitos inflamatórios e de morte celular, ocorre uma alteração significativa das sinapses glutamatérgicas: há redução das vesículas pré-sinápticas, porém com acúmulo de glutamato no sobrenadante que ocorre devido à falha na recaptação astrocitária, levando ao aumento dos receptores pós-sinápticos.

Conclusão

Esses achados sugerem que, embora o vírus não se replique nas células neurais estudadas, ele induz uma resposta inflamatória significativa, acompanhada de uma morte celular substancial e altera a função sináptica, o que pode contribuir para as disfunções neurológicas observadas em pacientes com COVID-19.

Financiamento: FAPESP e COVID Task-Force (Institut Pasteur). Financiamento pessoal: CAPES.

Referências

- 1 - Paniz-Mondolfi, A., et al., 92(7):699, 2020. doi: 10.1002/jmv.25915.
- 2 - Mao, L., et al., 77(6):1, 2020. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.1127.
- 3 - Taquet, M., et al., 18(9):e1003773, 2021. doi: 10.1371/journal.pmed.1003773
- 4 - Mesci, P., et al., 20(11):e3001845, 2022. doi: 10.1371/journal.pbio.3001845
- 5 - Magni, D.V., et al., 27(1): 65, 2008. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2008.09.004
- 6 - Cugola, F., et al., 534:267, 2016. doi:10.1038/nature18296

***Streptomyces paulista* sp. nov. Isolada do Rio Tietê na Região Central de São Paulo: Descoberta e Potencial Biotecnológico**

Autores: Oliveira R. V. F., Garrido L. M., Padilla G. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução

Esse trabalho busca reportar uma nova espécie do gênero *Streptomyces*, pertencente ao filo *Actinomycetota*, bactérias filamentosas, formadoras de esporos e notáveis por ser uma fonte promissora para novos produtos naturais.

Metodologia e resultados

O isolado NBS 10-01 foi obtido a partir de sedimento coletado no reservatório de Barra Bonita, no Rio Tietê, estado de São Paulo (Latitude: 22° 31' 23"/Longitude: 48° 31' 08") inoculado em ágar R2A incubado a 28° C por 7 dias. A colônia típica para o gênero *Streptomyces* foi isolada considerando sua morfologia característica, com formação de micélio no substrato e micélio aéreo com formação de esporos.

A caracterização genética por MLSA e Alinhamento de Genomas Completos foi realizada após análise do sequenciamento do genoma completo realizado pela empresa Macrogen (Seul – Coréia do Sul), em plataforma Illumina Hiseq2000 com cobertura de 350 vezes, com o DNA genômico obtido após extração por kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega). Além disso características morfológicas e metabolismo foram realizadas após cultivo em meios de cultura específicos, bem como tolerância a diferentes temperaturas, pH e salinidade. Testes de atividade antimicrobiana foram realizados por técnicas de antagonismo e com extratos metabólicos obtidos por extração em cultivo líquido. As análises genômicas indicaram que NBS 10-01 é uma nova espécie bacteriana apresentando um conjunto de clusters de genes biossintéticos inéditos. Essa conclusão é corroborada pela análise bioquímica e complementada pela morfologia. A nova espécie será provisoriamente nomeada como *Streptomyces paulista* em homenagem ao estado brasileiro onde foi coletada e estudada. A bactéria apresentou notável atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e negativas.

Conclusão

Streptomyces paulista NBS 10-01 representa uma relevante contribuição científica, mostrando que apesar de extensivamente estudado o gênero *Streptomyces* encontra-se longe de ser esgotado como fonte de novos bioprodutos. Mais estudos deverão ser realizados no futuro para caracterização completa do metabolismo secundário e outras atividades biológicas relevantes como potencial inseticida, antifúngico, anti-inflamatório, antitumoral e outros.

Financiamento: CAPES

UNDERSTANDING THE BUTIROSIN BIOSYNTHETIC ENZYMES IN THE FORMATION OF (S)-4-AMINO-2-HYDROXYBUTYRATE (AHBA) MOIETY

FREIRE, R.P.¹, PAGIATO, M.G.L.¹, DIAS, M.V.B.¹

¹ Departamento de Microbiologia. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Introduction and objectives: Butirosin is a natural aminoglycoside produced by *Niallia circulans* that has an interesting side chain moiety attached to the aglycone. The (S)-4-amino-2-hydroxybutyrate (AHBA) moiety, which is attached to the C'1 of the 2-deoxystreptamine (2-DOS) ring of Butirosin, confers to this antibiotic the capacity to evade the aminoglycoside modifying enzymes (AMES). This is the principal mechanism of resistance found for aminoglycosides. It is well known that antibiotic resistance is a concern for public health and the environment, which leads to worldwide research approaches to face this problem. Here, we are proposing to understand the role of the enzymes involved in AHBA biosynthesis, specifically using a combination of structural biology and biophysics methodologies. From this perspective, this project aims to study six enzymes (BtrJ, BtrI, BtrO, BtrU, BtrG and BtrH) from the Butirosin biosynthetic gene cluster, exploring their specificities for substrates at a molecular level. **Methods and results:** From the heterologous expression of these enzymes, we used *Escherichia coli* as the host organism, followed by a two-step purification. The purified enzymes are distributed into multiple physical-chemical analyses, such as SDS-PAGE, MALDI-TOF, ITC, crystallographic trials, and bioinformatic analysis. At this moment, we were able to successfully recover in a high purity grade (> 95%), five of the six enzymes planned to study. Two of them show a specific condition of crystallization (BtrU and BtrH), and refinement of the condition will lead us to solve the 3D structures. BtrJ has shown a high selectivity for your substrate (L-glutamate) rather than L-aspartic acid, as evidenced by ITC analysis. Currently, we submitted BtrO to crystallization trials and for apo-BtrI/holo-BtrI, are prospecting to solve the 3D by Nuclear Magnetic Resonance (NMR); nevertheless, this enzyme is crucial for the future ITC and SPR assays with the other enzymes. BtrG required a recloning step, as evidenced by the AlphaFold3 predicted structure, which shows that the current annotation has some unmodeled regions upstream of the catalytic domain. **Conclusion:** It is expected that from the methodologies involved in structural biology, as well as molecular biology and the recombinant DNA technique, we can understand how the interaction of these enzymes with the substrate allows the AHBA group to be formed. Based on that, we can propose strategies for the development of new molecules using combinatorial biosynthesis and synthetic biology mechanisms to evade resistance mechanisms in bacteria.

Acknowledgments: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 2022/13839-8 and 2022/12234-5) and CEPID B³ (FAPESP 2021/10577-0)

ELEMENTOS INTEGRATIVOS E CONJUGATIVOS SXT/R391 E SUA RELAÇÃO COM OS HOSPEDEIROS *PROTEUS MIRABILIS*

Fonseca, D. L. H., Galhardo, R. S., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

Introdução e Objetivos: A associação de elementos genéticos móveis (EGMs) com o aumento de bactérias multirresistentes tem se tornado cada vez mais preocupante, no entanto, a complexidade da relação desses elementos com seus hospedeiros é uma área que necessita de mais investigações. Elementos integrativos e conjugativos (ICEs) da família SXT/R391 são EGMs que se integram ao cromossomo e são capazes de ser transferidos horizontalmente, disseminando genes de resistência antimicrobiana principalmente entre membros das famílias *Vibrionaceae* e *Morganellaceae*. Nosso estudo buscou avaliar aspectos da relação entre o ICE*PmiJpn1*, um dos ICEs SXT/R391 mais disseminados, com seu hospedeiro natural *Proteus mirabilis*. **Métodos e Resultados:** Para esta investigação, utilizamos linhagens isogênicas (contendo ou não o ICE*PmiJpn1*), o que nos permitiu avaliar a influência deste elemento em aspectos da fisiologia, como *fitness*, auto-reconhecimento, *swarming*, biofilme e persistência, e patogenicidade de *P. mirabilis*, através de ensaio de infecção em *Galleria mellonella*. Descobrimos que o ICE*PmiJpn1* não impactou a capacidade de reconhecimento nem o *fitness* desta bactéria, causou um aumento na formação de biofilme em uma linhagem, diminuiu sutilmente a motilidade por *swarming* e não causou diferenças na patogenicidade e persistência de *P. mirabilis*. Por outro lado, através de ensaios de conjugação espontânea ou induzida, observamos que a transmissão deste elemento para uma linhagem de *E. coli* hospedeira é amplamente variável quando diferentes cepas de *P. mirabilis* são utilizadas como doadoras, mostrando que fatores específicos das cepas modulam a transmissão do ICE entre bactérias. Após análise por qPCR, verificamos que existem variações dos níveis de ICE circular excisado entre as linhagens, entretanto não há correlação da variação da conjugação com a capacidade de competição das linhagens e nem com os níveis de expressão dos genes envolvidos com a regulação da conjugação (*recA*, *setC* e *xis*) através da análise por RT-qPCR. Por fim, realizamos sequenciamento genômico das linhagens de *P. mirabilis* e verificamos que todas albergam o ICE*Pm1* e uma delas um elemento mobilizável. **Conclusões:** O ICE*PmiJpn1* não causa déficits na fisiologia e patogenicidade de *P. mirabilis*, indicando existir uma boa relação adaptativa entre este elemento e seu hospedeiro. Adicionalmente, não foi possível determinar um fator claro responsável pelas variações na conjugação deste ICE, embora o nível de ICE excisado pareça estar relacionado. **Apoio Financeiro:** Trabalho realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 001 e da FAPESP processos nº 2020/00535-5, 2021/15170-5 e 2022/03986-3.

PROMOTING PHOTOREPAIR IN UV-B IRRADIATED XP-C DEFICIENT CELLS VIA PHOTOLYASES MRNA TRANSFECTION

Zylberman, M.C., Sodré, F.C.M., Menck, C.F.M., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos

Various environmental factors damage DNA, and one of the most relevant is the ultraviolet (UV) component of sunlight. The primary DNA lesions induced by UV are pyrimidine dimers, more specifically cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and 6-4 pyrimidine pyrimidone (6-4PPs). In most organisms, these types of damage are efficiently repaired by photolyases, enzymes capable of repairing specific DNA damage when exposed to blue wavelength light. Nevertheless, photolyases are absent in placental mammals, where the nucleotide excision repair (NER) is the main pathway for the removal of these dimers. To further comprehend the genotoxic and mutational effects of CPDs and 6-4PPs isolatedly, we are employing a strategy with the transfection of CPD and 6-4PP photolyases mRNAs in NER deficient cells, mutated in the XP-C protein (XP-C cells). These cells are unable to remove CPDs or 6-4PPs in most of their genome.

Métodos e Resultados

The transfected cells were UVB-irradiated and exposed (or not) to photoreactivation with visible (blue) light. As a first step, to evaluate and establish conditions for mRNA transfection of the selected cellular lineages, the cells were transfected with enhanced green fluorescent protein (eGFP) mRNA. The eGFP expression was then evaluated by fluorescence microscopy 24, 48 and 72 h post transfection. Such analysis revealed not only the process' high efficiency in the used cell lines but also long-lasting expression, both crucial for the experiments with the photolyases encoding mRNA. The cells' dose susceptibility to UVB radiation was analyzed via clonogenic survival assay, which revealed a dose dependent sensitivity and confirmed the high sensitivity of XP-C cells, compared to the complemented cell lineage. However, in a pilot experiment using mRNA with CPD-photolyase mRNA we still did not succeed to observe an effect of photoreactivation on cell viability, regardless of previous UV-B irradiation, indicating that we still do not have the best condition to obtain photorepair.

Conclusão

New experiments must be performed with the aim to develop an mRNA transfection based strategy to remove specifically CPDs or 6-4PPs, to better understand the role of each of these lesions in UVB-irradiated XP-C cell survival and mutagenesis.

Agradeço às agências fomentadoras FAPESP, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

EFEITO DE UMA EXONUCLEASE CODIFICADA NO ICE SXT/R391 NA MUTAGÊNESE INDUZIDA POR UV E ANTIMICROBIANOS EM *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*

1, P.G.L., Gomes, 2, R.S., Galhardo, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introdução e Objetivos

Proteus mirabilis é uma bactéria gram-negativa frequentemente associada a infecções humanas, especialmente no trato urinário. Essas bactérias possuem vários mecanismos de virulência, tornando-as clinicamente significativas. Uma família de elementos genéticos móveis, conhecidos como ICE SXT/R391, desempenha um papel crucial na disseminação da resistência antimicrobiana e na evolução desta espécie. Esses elementos móveis, que incluem o gene *exo* em seu núcleo, codificam proteínas importantes para o reparo do DNA e a resposta SOS, influenciando potencialmente a mutagênese por antibióticos e/ou mutagênese em resposta à radiação UV. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a relação do ICE na mutagênese induzida por antimicrobianos, e a relação do gene da exonuclease presente no ICE SXT/R391 com a mutagênese induzida por UV, bem como seu papel na manutenção e conjugação deste elemento genético móvel.

Métodos e Resultados

Construímos mutantes com a deleção do gene *exo*, utilizando a técnica do sistema λ Red. Realizamos os testes de mutagênese por ciprofoxacina, sobrevivência por UV utilizando 4 doses diferentes, e o teste de mutagênese por UV utilizando uma dose e posteriormente selecionando os mutantes em rifampicina. Os resultados obtidos neste estudo mostram que, diferentemente de outros microrganismos, *P. mirabilis* não demonstrou mutagênese induzida por ciprofloxacina, mesmo na presença do ICE PmiJpn1, indicando especificidade no mecanismo de resposta antimicrobiana. Foi possível observar a influência contrária da presença do ICE em seu portador natural (*P. mirabilis*) onde houve aumento da sobrevivência de cepas portadoras do elemento móvel, enquanto em *E.coli* houve uma redução na sobrevivência com a presença do ICE. Porém, a deleção do gene *exo* não teve impacto significativo na sobrevivência, mutagênese e conjugação do ICE em *P. mirabilis* e *E. coli* após a irradiação UV.

Conclusão

A ausência de diferenças significativas na sobrevivência entre as linhagens com e sem o gene *exo* sugere uma possível interdependência com outras exonucleases presentes nos organismos estudados. O gene da exonuclease pode não desempenhar papel relevante durante a conjugação em *P. mirabilis* (doadora), pois a presença de outros mecanismos em *E. coli* (receptora) pode interferir nos resultados observados, indicando complexidade na resposta de conjugação. O gene *exo* pode também estar envolvido no reparo de outros tipos de lesões no DNA, diferente das lesões causadas pela luz UV. Portanto, estes resultados destacam a complexidade dos mecanismos de reparo do DNA e do metabolismo bacteriano, enfatizando a importância de investigações adicionais para entender completamente o papel funcional do gene *exo* e outros fatores envolvidos na sobrevivência e resposta ao estresse ambiental.

Apoio Financeiro

CAPES.

VARIABILIDADE E INOVAÇÃO GENÉTICA EM BACTÉRIAS DO GÊNERO ACINETOBACTER:
ANÁLISE DA RÁPIDA EVOLUÇÃO DE UM PATÓGENO EMERGENTE
Ogusku, B.S.C., de Souza, R.F. Departamento de Microbiologia. Instituto de Ciências
Biomédicas - USP

Introdução e objetivos:

O complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (complexo ABC) é considerado um grupo de patógenos oportunistas, composto pelas espécies *Acinetobacter baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *A. pittii* e *A. seifertii*. Espécies deste complexo causam infecções hospitalares que acometem principalmente pacientes imunocomprometidos e apresentam um perfil resistência acumulada à maioria dos antibióticos empregados na clínica médica que, somado a capacidade de persistência em superfícies abióticas, resultam em um alto número de infecções de difícil tratamento. A transferência horizontal neste gênero bacteriano implica em um pangenoma amplo e , tendo um alto número de genes presentes em apenas um ou poucos isolados sequenciados. Dentre os mecanismos de transferência horizontal, o gênero *Acinetobacter* apresenta um grande potencial de transformação associado a um comportamento de predação, onde o ataque mediado pelo sistema de secreção do tipo 6 (T6SS) leva à lise celular, permitindo a captação de fragmentos de DNA e sua incorporação ao genoma da bactéria. Em *Acinetobacter*, a conjugação aparenta ser a maior fonte de aquisição de genes de resistência a antibióticos, o que é possível graças à proximidade a outras bactérias resistentes no ambiente hospitalar. A literatura também sugere que há uma regulação entre os dois perfis descritos acima, com a participação de genes regulatórios como *TetR*, presente em plasmídeos conjugativos. Considerando descobertas recentes de funções de genes localizados próximos a *clusters* gênicos de elementos envolvidos com transferência horizontal, o objetivo deste projeto é explorar a vizinhança gênica destes *clusters* em bactérias do complexo ABC, na busca por genes de funções desconhecidas, contextualizar e investigar as famílias gênicas observadas e também fazer um levantamento de toxinas secretadas pelo T6SS.

Métodos e resultados:

Os genomas das espécies *Acinetobacter baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *A. pittii* e *A. seifertii* foram baixados do banco de dados BV-BRC, com a sua qualidade verificada pelo software CheckM e o pangenoma e os grupos de ortólogos foram montados pelo orthofinder. A presença dos sistemas de secreção foi verificada pelo software MacSyFinder. A exploração da vizinhança gênica será feita utilizando um suite de python produzido por nosso laboratório. Nesta fase do projeto, ainda estamos explorando os primeiros resultados, portanto resultados preliminares não podem ser descritos no momento, mas serão expostos no pôster a ser apresentado no congresso.

Conclusão:

Como o projeto ainda não apresenta resultados no momento, a conclusão fica para uma data posterior.

Apoio financeiro: CAPES e FAPESP

INVESTIGAÇÃO DE BIOMARCADORES TRANSLACIONAIS EM SINAIS ELÉTRICOS REGISTRADOS POR EEG E EM SINAIS ELÉTRICOS ADVINDOS DE ORGANOIDES CEREBRAIS COM APLICAÇÃO EM MODELOS DE CLASSIFICAÇÃO POR APRENDIZADO DE MÁQUINA. Tocantins, F.R., Fujita, A., Beltrão-Braga, P.C.B., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

Introdução e Objetivos

Nos últimos anos, apesar do aumento de diagnóstico de condições do neurodesenvolvimento, como o Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) e Transtorno de Atenção com Hiperatividade/Impulsividade (TDAH), por exemplo, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos biológicos envolvidos nesses transtornos. Neste contexto, se faz necessário o desenvolvimento de modelos neurobiológicos que mimetizem, de forma robusta, o funcionamento do sistema nervoso central (SNC). Estudos de avaliação de fármacos apontam similaridades entre sinais de eletroencefalograma (EEG) entre roedores e humanos, com padrões de sinais que possuem correspondência entre as duas espécies por conta de semelhanças funcionais. Tal correspondência suscita a hipótese de correlação de assinaturas de atividade entre sinais advindos de organoides cerebrais derivados de células tronco pluripotentes induzidas (iPSC) humanas e sinais de EEG de indivíduos. Sendo assim, este estudo visa explorar biomarcadores translacionais, ou seja, que possam ser efetivos na caracterização de condições avaliadas, tanto por sinais elétricos registrados por exames de EEG, quanto por sinais advindos de organoides cerebrais. Ferramentas de aprendizado de máquina foram utilizadas para identificar a relevância dessas medidas no estabelecimento de estratégias comparativas entre esses sinais, utilizando-as como fonte de dados para modelos de classificação. A partir dos resultados obtidos, espera-se gerar ferramentas para interpretação de respostas elétricas de organoides cerebrais, visando sua aplicação futura em estudos translacionais.

Métodos e Resultados

O estudo foi dividido em três etapas, sendo elas: (1) etapa de exploração de biomarcadores em EEG; (2) extração de biomarcadores dos exames de EEG e classificação de sinais por aprendizado de máquina; (3) etapa de avaliação de correspondência em sinais de organoides cerebrais derivados de iPSC. As etapas de (1) e (2) continuam em execução, sendo que a etapa (3) terá início nos próximos meses. Resultados prévios indicam como significativa a relação do neurodesenvolvimento com atributos como *total wavelet entropy* (TWE) e potência de sub-bandas de frequência beta e delta. Além disso, a classificação desses atributos mostrou-se promissora a partir do algoritmo de classificação *Random Forest Regression*.

Conclusão

Para os próximos passos da pesquisa, a exploração de biomarcadores e aplicação em modelos de aprendizado de máquina continuará paralelamente a etapa de avaliação de correspondência em sinais de organoides cerebrais, onde temos a intenção de utilizar dados de sinais elétricos adquiridos de experimentos com matriz de microeletrodos em organoides cerebrais.

Apoio Financeiro: CAPES

ASSESSING HOW ACONITASE AFFECTS GENE REGULATION IN CAULOBACTER CRESCENTUS. Pereira, J. P., Marques, M. V., Picinato, B. A., Koide, T., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: Aconitase is a protein known for its enzymatic action of catalyzing the conversion reaction of citrate to isocitrate in the Krebs Cycle, when bound to an FeS cluster. Additionally, in many organisms, such as *Escherichia coli*, this protein in its Apo form (without the FeS cluster) also has the ability to bind RNA, putatively altering its half-life and translation. *Caulobacter crescentus* is an alphaproteobacterium commonly used as a model organism for studying cell differentiation in prokaryotes. In *C. crescentus* this protein is part of the RNA degradosome, an important complex involved in RNA decay in prokaryotes. This project aims to evaluate if the aconitase of *C. crescentus* can bind to RNAs, identify these RNAs, and determine how it interferes in the expression of these RNAs.

Métodos e Resultados: the aconitase gene was cloned incorporating DNA encoding a FLAG tag in the suicide vector pNPTS138, and through double homologous recombination in *C. crescentus*, aconitase has the FLAG tag amino acids at its N-terminal end. Afterwards, to test the cell viability after the insertion of the FLAG tag into aconitase, since aconitase is an essential enzyme, growth assays were performed between the wild-type and the mutant strain, and the results showed no significant difference in cell growth. To evaluate if the added FLAG tag was being captured by the resin, total protein pulldown with an anti-FLAG resin followed by Western Blotting were performed, and the results showed that the protein was separated from the others. The FLAG-Aconitase strain was treated with the iron chelator 2,2'-bipyridyl, to induce the Apo form, and was used in large-scale assays of "High throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation" (HITS-CLIP) to obtain the RNAs binding *in vivo*. Crosslink, pulldown, and RNA extraction assays with Trizol for HITS-CLIP were initiated, and 11 subsamples were acquired. Of these subsamples, the six best (highest RNA concentrations and best purity measures) were selected and divided into 3 pairs (3 samples). These RNAs were sent for sequencing, on the NextSeq 500 Illumina large-scale sequencing platform available at the Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEFAP-USP), and will be analyzed by bioinformatics. the aconitase gene was cloned incorporating DNA encoding a FLAG tag in the suicide vector pNPTS138, and through double homologous recombination in *C. crescentus*, aconitase has the FLAG tag amino acids at its N-terminal end. Afterwards, to test the cell viability after the insertion of the FLAG tag into aconitase, since aconitase is an essential enzyme, growth assays were performed between the wild-type and the mutant strain, and the results showed no significant difference in cell growth. To evaluate if the added FLAG tag was being captured by the resin, total protein pulldown with an anti-FLAG resin followed by Western Blotting were performed, and the results showed that the protein was separated from the others. The FLAG-Aconitase strain was treated with the iron chelator 2,2'-bipyridyl, to induce the Apo form, and was used in large-scale assays of "High throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation" (HITS-CLIP) to obtain the RNAs binding *in vivo*. Crosslink, pulldown, and RNA extraction assays with Trizol for HITS-CLIP were initiated, and 11 subsamples were acquired. Of these subsamples, the six best

(highest RNA concentrations and best purity measures) were selected and divided into 3 pairs (3 samples). These RNAs were sent for sequencing, on the NextSeq 500 Illumina large-scale sequencing platform available at the Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEFAP-USP), and will be analyzed by bioinformatics.

Conclusão: The results of the sequenced RNAs in HITS-CLIP showed a tendency that those detected in greater abundance were previously defined in the literature as more expressed in iron deficiency situations. This indicates that this protocol is possibly biased by non-specific binding of highly abundant RNAs in iron-deficient cells to the affinity resin or aconitase itself. Consequently, it was concluded that this experiment should be repeated with some control conditions, such as without the addition of the iron chelator and also in the wild-type strain without the FLAG (to evaluate non-specific binding only to the resin).

Apoio Financeiro: FAPESP

DESENVOLVIMENTO DE APTÂMEROS PARA DETECÇÃO DE ESTREPTOCOCOS DO GRUPO B POR MEIO DE BIOCSENSOR ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO

Dias-Soares, M.; Garrido, L. M.; Padilla, G., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas – USP

Introdução e objetivos

A *Streptococcus agalactiae* (GBS) é uma bactéria gram-positiva que pode causar infecções em gestantes e neonatos, transmitindo-se verticalmente da mãe para o feto. As infecções podem resultar em complicações graves, como meningite ou até mesmo levando ao óbito. Estima-se que 150 mil óbitos, entre natimortos e morte precoce de crianças, ocorram por conta do GBS. Atualmente, o diagnóstico baseado em métodos convencionais, feitos por meio de cultivo e metodologias bioquímicas apresenta limitações, com número significativo de falsos negativos, justificando a busca por alternativas mais eficazes. Os aptâmeros, sequências curtas de oligonucleotídeos, surgem como uma alternativa promissora. Obtidos por meio da metodologia SELEX, esses oligonucleotídeos têm alta sensibilidade e especificidade por um alvo. Podem ser facilmente modificados e acoplados a diferentes compostos, como nanopartículas de ouro, formando apta-sensores. O objetivo deste trabalho é selecionar aptâmeros para detecção de GBS, utilizando a tecnologia Cell-SELEX, e acoplar estes aptâmeros a nanopartículas de ouro para formar aptassensores colorimétricos contra 7 cepas de GBS, criando uma metodologia rápida para a detecção destas bactérias.

Métodos e resultados

A metodologia proposta consiste em realizar o *Cell-SELEX* a partir de biblioteca de oligonucleotídeos de DNA juntamente com cepas de GBS e cepas de contra-seleção. O monitoramento da evolução da afinidade dos aptâmeros selecionados no *Cell-SELEX* é realizada por meio de qPCR. Uma vez obtido o pool de aptâmeros, estes serão sequenciados e terão suas estruturas secundárias previstas pelo *software* MFold. Após estes processos, os aptâmeros serão acoplados a nanopartículas de ouro para a formação dos aptasensores, que serão submetidos a testes de sensibilidade, especificidade e determinação de limite de detecção. Realizamos diversos processos de otimização do *Cell-SELEX*, amplificação por PCR e uso das nanopartículas de ouro, criando condições para a continuidade do trabalho. Verificamos aumento da afinidade por meio de qPCR (análise de *cT* e *melting curve*) até o *round 4* do *Cell-SELEX* em comparação a biblioteca original, após isso observamos aparecimento de efeito *ladder*, o que prejudica a afinidade dos oligonucleotídeos e conseqüentemente sua ligação ao alvo celular. Este material está sendo submetido a purificação de banda do gel de agarose para obtenção da banda pura sem efeito *ladder*.

Conclusão O desenvolvimento desta metodologia inovadora facilitará a identificação precisa e rápida de *Streptococcus agalactiae* em gestantes, permitindo intervenções terapêuticas oportunas e protegendo a saúde materno-infantil de complicações graves.
Financiamento: Capes e Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

PAPEL DA CÁPSULA CODIFICADA PELO CLUSTER WCB DE *BURKHOLDERIA CENOCEPACIA* H111 NA INTERAÇÃO COM MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW 264.7

Autores: FILIPPI, E.F.M.; ANDO, E. S.; ARAUJO, W.L.

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e objetivos

Bactérias do gênero *Burkholderia* ocupam diversos ambientes, tais como solo, água, plantas e animais, além de degradar mais de 100 compostos orgânicos. O grupo Bcc (*Burkholderia cepacia* complex) inclui *Burkholderia* spp. associados a pacientes com fibrose cística (CF), podendo causar infecções pulmonares graves. Membros do grupo BCC produzem uma capsula polissacarídica que pode atuar como fator de virulência, visto que pode estar associada à evasão do sistema imune do hospedeiro. Os genes que codificam a formação de componentes da cápsula e seu transporte para o exterior se encontram no cluster WCB. Em projetos anteriores do LABMEM (ICB-USP) foram gerados mutantes para este cluster WCB em *B. cenocepacia* H111 e os mutantes testados quanto à virulência a *Galleria mellonella*. Foi observado que a mutação de genes deste cluster pode levar ao aumento da virulência às larvas de *G. mellonella*, sugerindo que esta virulência pode estar associada a alterações na estrutura do exopolissacarídeo e não apenas pela presença da cápsula *per se*. Dessa forma, o presente estudo visa investigar o papel da cápsula (lipopolissacarídeo) de *B. cenocepacia* H111 na interação com macrófagos murinos.

Métodos e Resultados

A interação entre as cepas HM2 ($\Delta wcbC$ e proteína hipotética), HM3 ($\Delta wcbR$), HM6 ($\Delta fkbm$) e HM11 ($\Delta wcbA$ e $\Delta wcbB$) e macrófagos da linhagem RAW 264.7 foi avaliada através de ensaios de fagocitose. Ao atingir a fase mid-log de crescimento, as colônias bacterianas passaram por diluição seriada para infecção dos macrófagos a MOI de 1:50 e 1:100. Após incubação de 1 e 6 horas, o meio foi tratado com gentamicina para eliminação de bactérias não internalizadas. Após 2 horas, as células foram lavadas com PBS e lisadas com TRITON X100 0,05% para liberação das bactérias internalizadas. Posteriormente, 100 μ l dessa solução foram estriados sobre placa contendo meio PIA para estimar a concentração de bactérias. Também foi avaliada a secreção de IL-1 β nos sobrenadantes da cultura por meio de ELISA. Após 1 hora de incubação, as linhagens mutantes não apresentaram diferença significativa de internalização por macrófagos em comparação com a cepa selvagem. Após 6 horas, a cepa que apresentou maior densidade celular foi o mutante HM6 ($\Delta fkbm$ – metiltransferase), outras cepas não mostraram diferença significativa de internalização em relação à linhagem selvagem. O teste de ELISA foi feito com os sobrenadantes da incubação de 1 hora, tendo a cepa HM3 mostrado maior concentração de IL-1 β em relação à selvagem e ao controle.

Conclusão

Os resultados obtidos nos ensaios de fagocitose indicam que genes pertencentes ao cluster WCB podem estar associados à regulação da internalização de *B. cenocepacia*

H111. O teste de ELISA indicou uma diferença na resposta inflamatória gerada por HM3 ($\Delta wcbR$, gene envolvido na biossíntese de lipídeos), sugerindo que a capsula pode afetar de diferentes formas a interação com o hospedeiro.

Agência: FAPESP (2021/09835-4)

BIOGÊNESE COORDENADA DE CITOCROMO C OXIDASE E ATP SINTASE EM MITOCÔNDRIAS DE *S. CEREVISIAE*

Franco, L.V.R.¹, Tzagoloff, A.², Barros, M.H.¹

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

Department of Biological Sciences, Columbia University

Introdução e Objetivos

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela produção da maior parte do ATP em nossas células. Devido a este papel fundamental no metabolismo, sua disfunção está associada a muitas doenças. Utilizamos a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, organismo modelo para estudos de biogênese dos complexos da fosforilação oxidativa mitocondrial por inúmeras razões, entre elas a capacidade de sobreviver por fermentação (possibilitando a inativação de genes essenciais para respiração) e por ser o único organismo além da alga *C. reinhardtii* a ter a edição do genoma mitocondrial bem estabelecida. Citocromo *c* oxidase (ou complexo IV) e ATP sintase das mitocôndrias da levedura *S. cerevisiae*, assim como de humanos, são híbridos genéticos com alguns de seus polipeptídeos codificados pelo DNA mitocondrial e outros pelo DNA nuclear. Assim, o principal objetivo desse trabalho é entender os mecanismos moleculares pelos quais esses complexos, compostos por proteínas de diferentes origens genéticas, são formados.

Métodos e Resultados

Cox6 é uma subunidade do complexo IV codificada a partir do genoma nuclear e Atp9, uma subunidade da ATP sintase codificada a partir do genoma mitocondrial. Apesar de serem componentes de complexos distintos, mostramos que essas duas proteínas interagem entre si para formar intermediários que nomeamos de Atco. Através de ensaios de marcação radioativa em mitocôndrias isoladas, mostramos que Atco é a fonte exclusiva de Atp9 para a montagem da ATP sintase em linhagem selvagem. Ao extrair os complexos proteicos mitocondriais com digitonina e separá-los em gel nativo 4-13% de poliacrilamida por BN-PAGE seguido de *western blot*, mostramos que não há complexo IV no mutante nulo *atp9*. Por técnicas clássicas de biologia molecular e também por biolística, realocamos *COX6* do núcleo para o genoma mitocondrial. Essa linhagem apresentou capacidade respiratória, ainda que comprometida. Foi observada pouca associação entre Atp9 e Cox6, resultando em menores níveis de complexo IV, evidenciando a importância de Atco.

Conclusão

Nossos resultados indicam que Atco acopla a biogênese de citocromo *c* oxidase e ATP sintase em *S. cerevisiae*. Nossa hipótese é que há uma coordenação entre esses dois complexos para que estejam presentes em quantidades estequiométrica no sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial.

Apoio Financeiro: CNPq 173200/2023-0, FAPESP 2019/16015-3, FAPESP 2019/02799-2

MINERAÇÃO GENÔMICA E CLONAGEM EM ORGANISMOS HETERÓLOGOS PARA EXPRESSÃO DE CLUSTERS BIOSINTÉTICOS EM *STREPTOMYCES*

Martins, B. P., Garrido, L. M., Padilla, G. M., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introdução e objetivos

Streptomyces é um gênero de bactérias que possui elevado potencial metabólico, sendo altamente relevante na produção de moléculas com atividades biológicas, como atividade antimicrobiana e antitumoral. Em decorrência do aumento da resistência a essas moléculas, há necessidade prioritária na exploração de metabólitos deste gênero, em especial daqueles de classes menos exploradas, como os lantipeptídeos. Os lantipeptídeos se destacam pela presença de aminoácidos raros resultantes de modificação pós-traducional e por suas diversas atividades biológicas, entretanto, são caracterizadas apenas 20 destas moléculas advindas de actinomicetos. Um desafio na exploração de metabólitos de *Streptomyces* é a sua expressão em condições laboratoriais, dado há uma grande discrepância entre a quantidade de moléculas obtidas por espécie em laboratório e a quantidade de clusters biossintéticos (BGCs) presentes nos genomas destas bactérias. Deste modo, este trabalho se focaliza em explorar dados genômicos da *Streptomyces* sp. NBS 14-10 para realizar a clonagem de BGCs selecionados num hospedeiro heterólogo.

Métodos e resultados

Foi realizada uma nova montagem do genoma da NBS 14-10 baseada em sintonia, a qual levou à redução da fragmentação do genoma, que foi então submetido a uma análise no antiSMASH para observação dos BGCs presentes na bactéria. Dentre eles, foram selecionados dois BGCs de antibióticos para clonagem. Suas regiões gênicas foram delimitadas por análises *in silico* e as clonagens foram iniciadas pela metodologia TAR, que usa a maquinaria de recombinação homóloga de *Saccharomyces cerevisiae* para unir os fragmentos com o vetor. O plasmídeo contendo os insertos foi transferido para os hospedeiros finais - *S. coelicolor* M1146 e M1154 - e sua inserção no genoma foi confirmada por PCR. Foi feita uma extração dos metabólitos das cepas e os extratos obtidos tiveram suas atividades contra bactérias patogênicas constatadas. Por fim, foi feita cromatografia (HPLC) dos extratos obtidos. Foram observados picos diferenciais entre as linhagens que tiveram a inserção dos clusters e as M1146 e M1154, os quais foram coletados para futuras análises.

Conclusões

Neste trabalho foi possível realizar a melhoria dos dados genômicos da cepa NBS 14-10 e a montagem e análises *in silico* usadas permitiram a realização da clonagem TAR com alta eficiência. A clonagem foi confirmada molecularmente e para a conclusão da confirmação da produção dos peptídeos se fazem necessárias apenas análises de espectrometria de massas. Com isso, será possível fornecer para estudos futuros de atividade biológica e estrutura dois novos lantipeptídeos advindos de *Streptomyces*.

Apoio financeiro

Este projeto foi apoiado por bolsa CAPES.

Identificação de compostos que interagem com a DNA Girase de *Mycobacterium tuberculosis* através da triagem de fragmentos

Shiroma, Sabrina Tami; Rossini, Nicolas O.; Dias, Marcio V. Bertacine

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil.

Introdução: A tuberculose (TB), doença infecciosa causada pela *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), está entre as principais causas de morte por agentes infecciosos no mundo. Em casos de TB resistente à rifampicina e a qualquer fluoroquinolona, a taxa de sucesso no tratamento é tipicamente baixa. Tendo isso em vista, modificar as fluoroquinolonas existentes ou descobrir moléculas com novos mecanismos de ação, que tenham como alvo a DNA girase, é uma abordagem viável para o controle desta doença. Nesse contexto, aplicamos uma estratégia de desenvolvimento de fármacos baseado em fragmentos para identificar novos compostos.

Objetivos: Neste trabalho, nosso objetivo é identificar moléculas candidatas (fragmentos) que interajam com a enzima DNA girase de *M. tuberculosis*, através da triagem de fragmentos e validação ortogonal. Também, pretendemos observar a interação proteína-ligante através da cristalografia, além da clivagem do DNA pela girase induzida por fluoroquinolonas.

Materiais e Métodos: A região codificante dos genes *gyrA* e *gyrB*, que levam à produção da DNA girase, foi clonada em um plasmídeo pET28a e transformada em células competentes BL21 (DE3), expressa em meio LB e purificada usando cromatografia de afinidade e gel filtração. Com a proteína purificada, foram realizados ensaios de *Thermal Shift* (DSF), além da sua cristalização utilizando o método de gota pendurada. Adicionalmente, um ensaio enzimático da DNA girase foi conduzido através da clivagem de DNA na presença de fluoroquinolonas e analisado por gel de agarose.

Resultados e Discussão: Até o momento, a DNA girase foi expressa com sucesso, purificada em uma fração solúvel e utilizada em estratégias de triagem por *Thermal Shift*, onde identificamos moléculas promissoras. Esses fragmentos foram submetidos a análises por STD-NMR (Saturation Transfer Difference), que validaram as interações proteína-fragmentos. Além disso, obtivemos cristais da proteína, que foram coletados e levados para análise por difração de raios X. Por fim, também definimos as melhores condições para o ensaio enzimático da DNA girase, a fim de avaliar sua atividade da enzima.

Conclusão: A expressão e purificação da DNA girase apresentaram um alto rendimento, sendo essencial para a realização de experimentos de triagem de fragmentos, ensaios enzimáticos e cristalização da proteína. Também, conseguimos identificar e validar diversos fragmentos que ainda precisam da caracterização ortogonal. Portanto, com os ensaios realizados durante a execução deste projeto, concluímos que a proteína está pura e funcional, demonstrando potencial para a continuidade do trabalho.

Apoio Financeiro: FAPESP, CEPID B3

ORGANOSSELÊNIO PROTEGE GALLERIA MELLONELLA DA CRIPTOCOCOSE, INIBE FATORES DE VIRULÊNCIA DO CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS E INDUZ MORTE POR AUTOFAGIA, APOPTOSE E NECROSE

De Jesus, D.F.F.^a, Dos Anjos, R.M.^a, Oliveira, I.M.^b, Stefani, H.A.^b, Vallim^c, M.A., Biagini, Lopes, L.B.^a e Ishida, K.^a.

^aInstituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, SP, Brasil; Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ^bUniversidade de São Paulo, SP, Brasil; ^cDepartamento de Ciências Biológicas – Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil.

A criptococose ocorre em 278.000 indivíduos anualmente com índices de mortalidade de até 80%. Fato relacionado com a falta de acesso aos métodos de diagnóstico, ao limitado arsenal antifúngico, emergência de resistência e fatores de virulência fúngico traz um senso de urgência para pesquisa por novos antifúngicos. Deste modo, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar o potencial antifúngico *in vitro* e *in vivo* do organosselênio LQA_78, elucidar a morte celular em *Cryptococcus neoformans* e desenvolver um sistema nanocarreador para o LQA_78. A molécula inibiu o crescimento fúngico de linhagens padrão e isolados clínicos entre 4-32 µg/mL, bem como, importantes fatores de virulência como as células titãs e leveduras com cápsula espessa em 8-16 µg/mL. Além disso, a concentração de 8 µg/mL reduziu a produção de lacase e a melanização, diminuiu a espessura capsular com concomitante aumento da permeabilidade dessa estrutura em *C. neoformans*. O tratamento das leveduras com as concentrações fungicidas demonstrou a presença de populações leveduriformes em diferentes estágios de morte, sendo identificados células em autofagia, apoptose e necrose secundária. Deste modo, sendo desencadeado morte por autofagia em 32 µg/mL na cepa *C. neoformans* KN99α+GFP-Atg8, morte por apoptose em 16 µg/mL e necrose secundária 32 µg/mL na cepa *C. neoformans* H99 após análise de marcadores de morte (DCFH-DA, Iodeto de Propídio, TUNEL, R123, Hoechst 33342, Anexina V). Ao testar o tratamento de 40 mg/kg de LQA_78 nas larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. neoformans*, observou-se redução da carga fúngica, inibição na formação de células titãs e redução da espessura capsular das leveduras, como observado *in vitro*, mas o tratamento não aumentou a sobrevivência das larvas infectadas. No entanto, LQA_78 tem baixa solubilidade em água e alta toxicidade no modelo *G. mellonella* e células de mamíferos. Nesse sentido, um nanocarreador de PLGA foi desenvolvido para reduzir a toxicidade e aumentar a solubilidade do LQA_78. Nas larvas, os nanocarreadores (PLGA vazio e PLGA+LQA_78) não foram tóxicos na dose mais alta testada (40 mg/kg), além disso, reduziu significativamente a carga fúngica, protegendo mais de 40% das larvas da morte. Para concluir, o LQA_78 inibiu fatores de virulência de *C. neoformans* e induziu morte celular por autofagia, apoptose e necrose. Além disso, o nanocarreador PLGA é seguro e eficaz *in vivo*, destacando o uso potencial de LQA_78 para tratar criptococose.

Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPESP

ESTUDO DE TERPENOS EM ACTINOBACTÉRIAS: DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOATIVO

Almeida, G.B., Perez B., Oliveira R., Garrido.L.M., Padilla, G. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos

Actinobactérias é um filo de bactérias extremamente importante à medicina, pois dele é extraído cerca de 50% das moléculas obtidas a partir de microorganismos. Dentre os compostos produzidos pelas actinobactérias, estão os terpenos, extremamente interessantes à indústria farmacêutica por conta da variedade de funções desde vitaminas até agentes anticancerígenos. No entanto, apesar do grande potencial dos terpenos encontrados nas actinobactérias, quando se observa os bancos de dados online, especificamente o UNIPROT, percebe-se que tais compostos não são tão estudados quantas outras moléculas, e que há lacunas no entendimento atual sobre sua produção. Este estudo almeja delinear a diversidade de enzimas envolvidas na produção de terpenos nas actinobactérias, para que o processo de descoberta de novos terpenos possa ser mais direcionado.

Métodos e Resultados

Os dados foram obtidos através da pesquisa por “Terpene Synthase Actinobacteria” do banco de dados UniProt, o que gerou 924 resultados de proteínas. Após uma análise no Excel, foi observada a presença de 17 famílias e 48 gêneros datados no banco de dados. Dos 48 gêneros, os com maior número de entradas foram *Streptomyces* (286), *Actinomadura* (122), *Nonomuraea* (82), *Micromonospora* (73) e *Kitasatospora* (60). Tendo os dados tratados, a coluna “Entry” foi copiada e colocada na plataforma Enzyme Similarity Tool que uniu as proteínas por similaridade. Para que grupos coesos fossem criados, utilizou-se um mínimo de 50% de semelhança entre as proteínas (score 79) e 95% de ID. Tais dados foram identificados pelo Enzyme Similarity Tool, e transferidos à plataforma Genome Neighborhood Tool. O aplicativo Cytoscape foi utilizado para que fossem observadas as redes de conexão entre as enzimas. Pesquisando por IDs achados em cada grupo do Cytoscape no Genome Neighborhood Tool, observou-se que existem 66 grupos com clusters diferentes e que expressam no mínimo duas enzimas relacionadas à produção de terpenos. Dentre os 17 grupos que expressam 4 proteínas mais coesos, isto é, cuja maioria das proteínas vêm de um mesmo gênero - o que facilita o estudo - o gênero *Streptomyces* é maioria em 8, o *Nonomuraea* em 4, o *Micromonospora* em 3, o *Actinomadura* em 1 e o *Kitaspora* em 1.

Conclusão

Uma tendência demonstrada com essas análises é de que não necessariamente os gêneros mais estudados terão mais clusters fáceis de estudar. Por exemplo, o gênero *Micromonospora* está relacionado a três vezes mais clusters do que o gênero *Actinomadura*, mesmo tendo 59% do número de entradas da *Actinomadura*. Em suma, os resultados encontrados sugerem que um aumento do número de pesquisas em gêneros menos estudados pode resultar em um maior número de descobertas de terpenos.

MODELAGEM DA INFECÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA A EM CÉLULAS NEURAIS DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS

CANO¹ A.C.S.S., BELTRÃO-BRAGA^{1,2} P.C.B.,¹Universidade de São Paulo – Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas2-USP; ²Instituto Pasteur de São Paulo.

O vírus Influenza A, agente etiológico da "gripe", pertence à família *Orthomyxoviridae* e é classificado em quatro subtipos principais: Influenza A, B, C e D. Além do trato respiratório, o Influenza pode ter uma ação no sistema nervoso, em especial no desenvolvimento cerebral dos fetos, mas esses mecanismos ainda não estão completamente elucidados. Buscando elucidar a fisiopatologia do Influenza no SNC, este trabalho utilizou células neuroprogenitoras (NPC) derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) para estudar os efeitos da infecção no cérebro. Para tanto, foi necessário padronizar o protocolo de infecção viral, já que a cepa viral utiliza uma protease específica para completar seu ciclo infeccioso. Assim, estabelecemos um protocolo para determinar a concentração ideal de tripsina para favorecer a transdução viral. Nossos estudos revelaram que o vírus Influenza A (subtipo H1N1, cepa pdm09) é capaz de infectar as NPC. A infecção foi confirmada utilizando ensaio molecular de qPCR no sobrenadante celular; e celular utilizando ensaios de imunofluorescência com anticorpos para os tipos celulares e para o Influenza. Comparando as NPC infectadas e não infectadas (controle), ambas tratadas com a concentração de tripsina estabelecida para favorecer a transdução viral, foi possível observar a morte das células controle antes das células expostas ao vírus, sugerindo que o Influenza A pode expressar proteínas que ativam vias de sobrevivência celular em células cerebrais. Notavelmente, o potencial do vírus Influenza em prolongar a sobrevivência celular pode estar relacionado a ação combinada entre proteínas virais e celulares, que podem ser exploradas em tratamentos terapêuticos futuros. Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

INSIGHTS INTO THE FUTURE: NEUTRALIZING ANTIBODY RESPONSE FOLLOWING COVID-19 BIVALENT VACCINATION

Farias, J.P., Souza, M.S.S., Andreato-Santos, R., Silva, M.P., Brito, R.D.S., Silva, M.D.B., Peter, C.M., Castro-Amarante M.F., Durigon, E.L., Maricato, J.T., Braconi, C.T., Ferreira, L.C.S., Janinni, L.M.R., Amorim, J.H. Departamento de Microbiologia. Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction: The raising of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) variants led to the use of COVID-19 bivalent vaccines, which include antigens of the wild-type (WT) virus, and of the Omicron strain. In this study, we aimed to evaluate the impact of bivalent vaccination on the neutralizing antibody (NAb) response.

Methods and Results: Here, we investigated the antibody neutralization response against different variants of SARS-CoV-2 using serum samples from 93 healthy volunteers (31 males and 62 females), aged between 16 and 84 years, from Barreiras, BA, Brazil. They received three or four doses of COVID-19 monovalent vaccines (n = 61) or a booster shot with a bivalent vaccine (n = 32). The vaccination recordings of volunteers who received only monovalent vaccines varied in immunizations with homologous or heterologous regimens of Sinovac-CoronaVac (based on a purified inactivated virus),⁸ Oxford/Astrazeneca (AZD1222 or ChAdOx1-S), which is based on an adenovirus vector encoding the spike (S) protein of SARS-CoV-2,^{9,10} and Pfizer (BNT126b2, RNA-based vaccine).^{11,12} The bivalent vaccine (COMINARTY Original/Omicron BA.4-5 COVID-19 vaccine) used as a booster shot was mainly a fifth dose after monovalent-based vaccine regimens. In addition, immunoinformatics to quantify and localize highly conserved NAb epitopes were performed. As main result, we observed that the neutralization titers of samples from individuals vaccinated with the bivalent vaccine were higher for the original virus, in comparison to their capacity of neutralizing the Omicron variant and its subvariants. NAb that recognize epitopes mostly conserved in the WT SARS-CoV-2 were boosted, while those that recognize epitopes mostly present in the Omicron variant, and subvariants were primed.

Conclusion: Our results indicate that the NAb response after immunization with the COVID-19 bivalent vaccine was mainly boosted against the WT SARS-CoV-2, while was primed against the more recent Omicron subvariants. As so, our conclusions highlight that the update of future COVID-19 vaccines should consider to use only circulating viruses, and not viruses which were epidemiologically replaced and no longer circulate in the human population.

Funding information: The study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, grant numbers 20/05204-7, 20/06409-1, 20/08943-5, 21/05661-1, 22/11981-1 e 23/01925-0).

RESEARCH OF SMALL REGULATORY RNAs IN RESPONSE TO STRESSES IN *CAULOBACTER CRESCENTUS* Neves 1, W.S., Marques 2, M.V., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP. CEPID Biology of Bacteria and Bacteriophages Research Center (CEPID B3)

Introduction. Post-transcriptional regulation is a strategy that plays a fundamental role in adapting the expression profile of bacteria in response to stimuli and stress caused by changes in the surrounding environment. Small non-coding RNAs (sRNA) are involved in this regulatory process, enabling the recognition of target mRNAs and the formation of the sRNA-mRNA complex. This may block or release the Shine-Dalgarno (SD) region, affecting translation, and/or expose sites recognized by RNAses or stabilize the mRNA molecule. In previous work by our research group on *Caulobacter crescentus*, a free-living gram-negative alphaproteobacteria, an increase in the expression of 2 sRNAs with unknown function was identified in response to low temperature. **Goals.** Our objective is to identify post-transcriptionally regulated genes by observing the effect of these sRNAs on gene expression, helping to understand the function of these sRNAs. **Methods and results.** A mutant strain was produced with deletion of either sRNA by homologous recombination using the suicide vector pNPTS138. In addition, we constructed strains with a pMR20 vector containing each sRNA gene regulated by a xylose promoter (Pxyl), generating complemented strains. These *C.crescentus* strains were subjected to phenotype assays such as viability at 15°C, freezing assay and growth at 15°C. When observing the phenotype assays comparing the mutants with the wild-type strain growth both in cold (15°C) and at optimal temperature (30°C) it was observed that growth was similar between the strains. The expression profile of sRNAs was defined after induction by 0.3% xylose, performing RNA extraction with Trizol at different induction times, after which cDNA synthesis was performed followed by qRT-PCR assay. One of the future objectives of the work is transcriptomic sequencing (RNA-seq) to verify the impacts of overexpression of our sRNAs, and the best induction time with xylose from the Pxyl promoter was defined as 1 hour of induction by qRT-PCR, with an increase of about 1.5X. Growth curves were developed with the sRNA mutant strains compared to NA1000, where, mainly in the cold condition, a subtly increased growth could be observed in one of the mutant strains, indicating that its function may be related to the fine-tuning of cell growth in response to external stresses. For the other mutant strain, no change in growth was observed compared to the wild-type strain. **Conclusion.** The results obtained so far makes it possible to continue searching for the effects of these sRNAs, with future phenotypic tests, such as growth in minimal medium or mobility assay, and global RNA-sequencing.

Financial support: FAPESP; CAPES

Alerta de *Candida auris* na América do Sul: uma atualização epidemiológica e terapêutica

Gabriel Davi Marena¹ e Carlos Pelleschi Taborda^{1,2*}

¹Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (ICB-USP), São Paulo 05508000, Brasil.

²Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Departamento de Dermatologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Introdução e objetivo

Candida auris é uma espécie emergente de grande preocupação clínica devido à sua capacidade multirresistente. Além disso, é um microrganismo oportunista causador de infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos e hospitalizados. Na América do Sul, os primeiros casos de *C. auris* surgiram entre 2012 e 2013 na Venezuela, e os casos continuaram a aumentar desde então, preocupando os setores de saúde na região. Na Colômbia, por exemplo, a incidência de candidemia varia de 0,74 a 6 por 1000 internações hospitalares. Em vista disso, este estudo de revisão tem como objetivo fornecer informações atualizadas sobre o cenário epidemiológico de *C. auris* na América do Sul, bem como discutir novas terapias para combater esse patógeno fúngico.

Metodologia e resultados

Foi realizada uma busca na literatura a fim de reunir as principais informações atualizadas sobre o cenário atual da infecção no mundo e, principalmente, na América do Sul. Os resultados apontam para um preocupante aumento nos casos de *C. auris*.

Conclusão:

A infecção sistêmica causada pelo fungo emergente multirresistente *Candida auris* aumentou drasticamente nos últimos anos, inclusive em países em desenvolvimento no continente sul-americano. Mesmo com o fim da pandemia, os casos de *C. auris* continuam aumentando na América do Sul. Há uma necessidade contínua de vigilância cuidadosa, incluindo o rastreamento de tipos de clado, à medida que a ameaça do *C. auris* continua. Esta revisão também apresentou uma ampla descrição da pesquisa sobre abordagens terapêuticas para combater o *C. auris*. Medicamentos recentemente aprovados por organizações internacionais, rezafungina por exemplo, bem como outros medicamentos experimentais, foram abordados nesta revisão. Além disso, estudos envolvendo o desenvolvimento e avaliação antifúngica de possíveis novos candidatos com potencial ação vacinal e nanoterápica contra *C. auris*, estudos in vivo e in vitro, foram incluídos.

Financiamento:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DE *Cryptococcus neoformans* NA SUSCEPTIBILIDADE AO FUNGICIDA TEBUCONAZOL

Magalhães, M.H.C.¹; Miranda, I.L.²; Leocádio, V.A.T.²; Peres N.T.A.²; Santos, D.A.²

¹ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP. ² Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

Introdução e Objetivos

Cryptococcus neoformans é o principal agente etiológico da criptococose, uma doença que afeta especialmente imunocomprometidos, se manifestando como uma infecção sistêmica que pode evoluir para uma meningite fatal, acarretando cerca de 180 mil mortes anuais. Visto que *C. neoformans* é também encontrado no ambiente, ele está sujeito ao uso indiscriminado de agroquímicos e à seleção de linhagens resistentes a estas substâncias. Desta forma, devido à similaridade química dos antifúngicos azóis, tanto ambientais, como o Tebuconazol, quanto clínicos, a resistência cruzada se torna iminente, demandando uma grande atenção aos mecanismos que permitem o fenômeno da resistência aos agroquímicos. Assim, este trabalho objetiva avaliar a influência de fatores de transcrição de *C. neoformans* na susceptibilidade ao antifúngico Tebuconazol.

Métodos e Resultados

Uma triagem químico-genética determinou a Concentração Inibitória Mínima de Tebuconazol para 322 mutantes de *C. neoformans* H99 com deleções em 155 diferentes fatores de transcrição, resultando na seleção de 17 linhagens resistentes em comparação à linhagem selvagem H99. Em seguida, foi realizada uma análise de ontologia gênica dos genes deletados dos mutantes resistentes, associando estes a diversos fatores, incluindo regulação dos processos biossintéticos de RNA e melanina e resposta ao estresse oxidativo. Em seguida, para a conexão dos genes deletados com a susceptibilidade ao Tebuconazol, foram selecionadas nove substâncias para mapeamento da resposta dos mutantes a diferentes estresses, sendo estas relacionadas aos estresses: osmótico, de retículo endoplasmático, oxidativo e de parede e membrana celular. Assim, os mutantes crescidos na droga em concentração sub-inibitória foram expostos, em cinco diferentes concentrações, aos nove meios contendo os estressores. Como resultado, obtivemos linhagens cujas respectivas deleções ocasionaram um crescimento maior ou menor em comparação à linhagem H99 controle em determinados estresses. Assim, se a deleção induziu um crescimento maior que o do controle, houve adaptações para o fungo e a presença do fator estaria associada à sensibilidade; já no caso de a deleção induzir um crescimento menor que o do controle, a deleção gerou perda de resistência e sua presença estaria associada à resistência. Portanto, localizamos fatores transcricionais associados à resistência ao Tebuconazol e rastreamos raízes de tal resistência.

Conclusão

Foram identificados fatores transcricionais envolvidos na resistência ao Tebuconazol e consequentemente aos azóis. Compreender esses mecanismos de resistência é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e tratamento da criptococose.

Apoio Financeiro

PIBIC/FAPEMIG

AVALIAÇÃO DO PROGRESSO DE APRENDIZAGEM DOS ESTUDANTES DE GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA: MODELO *ESCHERICHIA COLI*.

BARONI 1, L.N., CANJANI 2, R.B., BRITO 3, S.C. M., ARMELLINI 4, B. R. C., OGUSKU 5, B.S.C., SOUZA 6, R.F., MORENO 7, A.C.R., FERREIRA 8, R.C.C., Departamento de microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

Introdução e objetivos: Com o propósito de avaliar o progresso dos alunos de graduação do curso de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo empregamos uma metodologia ativa, denominada “Adote uma Bactéria”, na disciplina de bacteriologia. Com esse objetivo, focamos na espécie *Escherichia coli* como modelo para explorar conceitos fundamentais em áreas como genética, morfologia e patogênese bacteriana.

Metodologia e Objetivos: Com intuito de validar a metodologia ativa, buscou-se levantar métricas inerentes a riqueza do discurso e complexidade de informações geradas pelos alunos em troca de informações postadas em rede social (Instagram®) ao longo de dois anos (2022 e 2023) do grupo que adotou a bactéria *Escherichia coli*. As análises foram feitas por meio de cálculo de diversidade de discurso por meio da determinação de índices de Shannon e linguagem Python. Os resultados demonstraram que as postagens sobre as três temáticas propostas foram complexas nos três tópicos abordados (morfologia, genética e patogenicidade), e nesses três tópicos apresentaram um aumento da riqueza dos discursos empregadas pelos alunos no ano de 2023. E os gráficos gerados pela linguagem Python complementam esses dados, demonstrando que em 2023 apresentam mais palavras em destaque do que em 2022 nos tópicos abordados nesse trabalho.

Conclusão: A estratégia de ensino calcada no modelo “Adote uma Bactéria” ampliou o repertório de conceitos e a complexidade de discurso dos alunos nos tópicos de patogenicidade, morfologia e genética com engajamento e interesse dos alunos pela microbiologia. Além de ressaltar a relevância da aplicação de metodologias ativas no processo de aprendizagem o potencial para aumentar o interesse dos alunos pela microbiologia, podendo ser aplicadas a diferentes disciplinas e campos do conhecimento. O trabalho foi financiado pelas empresas de fomento Capes, CNPQ, FAPESP/CEPID 3.

RELAÇÃO ENTRE A IDADE E A SATISFAÇÃO DOS MEDIADORES EM PARTICIPAR DO PROJETO “ADOTE UMA BACTÉRIA”

Armellini, B.R.C.¹, Almeida, L.G.², Ferreira, R.C.C.¹, 1. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP; 2. Instituto Questão de Ciência

Introdução e Objetivos: O “Adote uma Bactéria” é uma metodologia ativa de ensino desenvolvida nos cursos superiores de Ciências Biomédicas, Ciências Fundamentais para a Saúde e Odontologia da Universidade de São Paulo. Ela utiliza redes sociais para o ensino de Microbiologia, com apoio de estudantes de graduação e pós-graduação que atuam como mediadores do projeto. A atuação dos mediadores é essencial, especialmente em uma metodologia ativa, pois auxiliam os estudantes na construção do próprio conhecimento e a promover uma aprendizagem significativa. Para desempenhar bem suas funções, os mediadores recebem treinamento e desenvolvem competências e habilidades educacionais, o que pode ser extremamente benéfico para seu futuro profissional, especialmente se pretendem seguir carreira como professores universitários. Por isso, é crucial que os mediadores se sintam confortáveis com as atividades propostas e avaliem positivamente a experiência vivida. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto da idade dos mediadores em sua satisfação com as atividades do “Adote uma Bactéria”.

Métodos e Resultados: 26 mediadores responderam a um questionário ao final de sua participação no projeto. As respostas foram analisadas para identificar padrões utilizando a Análise Fatorial Exploratória (EFA). A EFA nos ajuda a entender como diferentes respostas estão relacionadas e a agrupar perguntas que medem aspectos semelhantes. Avaliamos a qualidade do modelo pelo valor do qui-quadrado. Os resultados da EFA foram aplicados na Análise de Componentes Principais (PCA) para criar uma escala que mede a percepção de satisfação dos mediadores sobre o projeto “Adote uma Bactéria”. A PCA agrupou as questões que julgamos estarem relacionadas à satisfação dos mediadores com o projeto, de forma a maximizar a variação explicada e identificar os principais componentes que resumem essas respostas. Por fim, analisamos como a percepção de satisfação dos mediadores se relacionava com variáveis como gênero, idade e escolaridade, utilizando um modelo de regressão linear. O modelo estimou que há uma relação estatisticamente significativa e inversamente proporcional entre idade e percepção de satisfação sobre o projeto “Adote uma Bactéria”.

Conclusões: Com base nas análises estatísticas realizadas e nos resultados obtidos, pode-se concluir que a idade é um fator importante para a percepção de satisfação dos mediadores sobre o “Adote uma Bactéria” e as atividades propostas em seu desenvolvimento, sugerindo que mediadores mais jovens se sentem mais satisfeitos com atividades promovidas pelo projeto.

Este projeto conta com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – CEPID B3).

ESTUDO BASEADO EM FRAGMENTOS PARA IDENTIFICAR INIBIDORES ALTERNATIVOS PARA DIIDRODIPICOLINATO SINTASE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

ROSA¹, L. V. S.; ROSSINI², N.O.; e DIAS³, M. V. B.; Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Introdução e Objetivos

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e é uma das principais causas de morte no mundo. Devido ao surgimento de cepas multirresistentes, há necessidade da busca por novos fármacos para realizar tratamentos mais eficazes e seguros. Parte do sucesso do MTB como patógeno se deve à sua complexa estrutura de parede celular, que inclui peptidoglicano, uma camada de arabinomanano e ácidos micólicos. Na formação de ligações cruzadas de peptidoglicano, o meso-diaminopimelato é consumido como substrato, esta molécula por sua vez é sintetizada na via do diaminopimelato. A enzima precursora desta via é a di-hidropolinato sintase (DapA), que também participa da síntese de lisina em bactérias, apresentando alto potencial como alvo farmacológico para a busca de inibidores para o desenvolvimento de novos antimicrobianos seguros para humanos, o qual consiste o objetivo deste trabalho.

Métodos e Resultados

Para atingir esse propósito, a construção plasmidial com o gene alvo foi introduzida em células de *E. coli* competentes para a produção da enzima, então purificada por afinidade e exclusão molecular, e posteriormente submetida a ensaios biofísicos como fluorimetria de varredura diferencial (DSF), ressonância magnética nuclear por diferença de transferência de saturação (STD-NMR), calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e ensaios de co-cristalização com os ligantes identificados entre uma biblioteca de fragmentos interna. Tivemos sucesso na obtenção da proteína pura e solúvel, o que permitiu a realização de diversas técnicas biofísicas que chegaram à identificação de oito compostos que se ligam a DapA, e dentre os ensaios de co-cristalização realizados até então, já foi resolvido uma estrutura com a presença de um desses oito compostos em complexo com a proteína.

Conclusão

Assim, este trabalho produziu contribuições para o desenvolvimento futuro de novos fármacos para o tratamento da tuberculose.

Palavras-chave: tuberculose, via da lisina, diaminopimelato, descoberta de fármacos, cristalografia de proteínas.

Apoio Financeiro

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2022/03967-9).

MAPEAMENTO DE EPITOPOS DE CÉLULAS B PARA AS PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS DO VÍRUS ZIKA

Soares, A.P. ¹; Olórtégui, C.D.C. ²; Neto, D.F.L. ¹; Passos, S.D. ³; Cunha, M.P. ^{1,4}; Zanotto, P.M.A. ¹

1. Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
2. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
3. Faculdade de Medicina de Jundiaí, Jundiaí, São Paulo, Brasil.
4. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

Introdução e objetivos

Em 2015, o surto do vírus Zika (ZIKV) no Brasil chamou a atenção da comunidade global, levando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar uma emergência de saúde pública. Anteriormente, o vírus foi identificado pela primeira vez em 1947, sendo posteriormente tratado como um agente viral discreto até começar a ser associado aos casos de microcefalia e malformações congênitas que emergiram no Brasil em 2015. O ZIKV é um arbovírus transmitidos entre hospedeiros vertebrados principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, é pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Orthoflavivirus*, que possui um genoma de fita simples de RNA senso positivo (+ssRNA) com aproximadamente 11 kb. A sua baixa relevância clínica, sintomatologia difusa e a cocirculação com outros arbovírus nas regiões endêmicas, tornam o seu diagnóstico clínico diferencial complexo, e além destes fatos, as plataformas diagnósticas com base na identificação de marcadores por sorologia também encontram dificuldades em resultados com especificidade diagnóstica. Frente à este cenário, o presente trabalho apresenta como objetivo realizar o mapeamento abrangente de epítomos de células B para as proteínas não estruturais do ZIKV, a fim de estabelecer os perfis de reconhecimento antigênico utilizando soros de mães e seus recém-nascidos apresentando sorologia positiva para IgG anti- ZIKV.

Métodos

Amostras de soro IgG positivas para ZIKV de mães e seus recém-nascidos foram triadas por ELISA e selecionadas para o mapeamento de epítomos de células B. Para caracterizar os epítomos, a técnica de *SPOT-synthesis* foi empregada com o intuito de maximizar a quantidade de antígenos das proteínas de ZIKV expostas às amostras selecionadas. Esta técnica permite a criação de uma ampla diversidade de peptídeos em uma membrana de nitrocelulose, onde aminoácidos são depositados em pequenos spots com alta precisão. Para a caracterização, comparações com amostras de soro IgG positivas para o vírus Dengue foram realizadas no intuito de identificar regiões e/ou epítomos com reatividade cruzada para as proteínas de ZIKV. Como controle negativo, também foi utilizado um soro naíve comercial. Os dados foram plotados e analisados utilizando o software RStudio.

Resultados e Conclusões

Os resultados encontrados indicam que as proteínas NS1 e NS5 do ZIKV possuem regiões com alta reatividade e com o potencial de reconhecimento de antigênico por células B. Entre todas as proteínas não estruturais, a NS1 mostra-se altamente imunogênica, como já foi descrito na literatura para os *Orthoflavivirus*. A proteína NS5 possui peptídeos com elevada reatividade, porém com um padrão distinto para o grupo dos recém-nascidos. Quando comparando a

resposta induzida pelas amostras IgG positivas para ZIKV e DENV frente à exposição aos epítomos de ZIKV, observa-se um padrão distinto, com destaque para a identificação dos peptídeos da proteína NS5 pelos soros positivos para IgG anti-ZIKV, o que é sugestivo para a presença de peptídeos específicos nesta proteína. Os resultados encontrados fornecem percepções importantes para a utilização de epítomos e proteínas em ensaios de diagnóstico e desenvolvimento de vacinas, e destacam a técnica *SPOT-synthesis* como uma importante técnica para mapeamento de peptídeos.

Apoio Financeiro

O projeto recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (projeto #441105/2016-5), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (projeto #2017/23281-6), e do projeto tripartite Fiocruz/Pasteur/USP (projeto #314502).

IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS ATIVAS CONTRA A ENDOPEPTIDASE RIPA DE M. TUBERCULOSIS

SILVA, C.S.¹, TINOCO, L.W.², SFORÇA, M.³, BARROSO, V.M.¹, ISHIDA, K.¹, GUTERRES, K.B.¹, GUIMARÃES, A.M.S.¹, RODRIGUES, V.L.T.⁴, EMERY, F.S.⁴, DIAS, M.V.B.¹.

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas – USP, ²Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais - UFRJ, ³LABORATÓRIO Nacional de Biociências – CNPEM,

⁴Departamento de Ciências Farmacêuticas – FCFRP/USP.

Introdução e Objetivos A tuberculose segue líder nos índices de incidência e mortalidade dentre infecções causadas por um único agente infeccioso. Este fato tem impulsionado a busca por novas terapias, incluindo estratégias para a identificação de alvos promissores. A enzima RipA (*Rpf-interacting protein A*) é responsável pela hidrólise das ligações cruzadas do peptidoglicano em micobactérias. Estudos sugerem que RipA é um fator-chave no controle do crescimento e da divisão celular em *Mycobacterium tuberculosis*. Além disso, como RipA participa no processo de reativação das micobactérias e em mecanismos de interação patógeno-hospedeiro, a endopeptidase é um alvo atraente para o planejamento de novos fármacos anti-tuberculose. O presente trabalho teve como objetivo identificar as primeiras moléculas inibidoras de RipA a partir da abordagem de descoberta de fármacos com base em fragmentos (FBDD).

Métodos e Resultados Obtivemos uma construção truncada de RipA, e a produzimos por expressão heteróloga em *E. coli* (DE3). Testamos a enzima purificada contra uma biblioteca de fragmentos composta por cerca de 600 moléculas, por ensaio de deslocamento térmico (DSF). Dos 53 possíveis *hits*, validamos 11 moléculas como ligantes de RipA pelas técnicas de STD-RMN e *MicroScale Thermoforesis*. Estas moléculas também foram testadas *in vitro* contra cepas de referência do complexo *M. tuberculosis* para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Em geral, os ligantes de RipA são polares e possuem pelo menos um anel de seis membros. Curiosamente, a maioria dos ligantes heterocíclicos interagem com RipA por átomos que compõem sua estrutura de anel, enquanto os outros têm os substituintes de alquila como os epítomos de interação. A afinidade de ligação dos fragmentos à RipA variou de μM a baixo mM. Vale a pena mencionar que encontramos duas moléculas com $K_D = 90 \mu\text{M}$, maior do que o esperado para este estágio. Além disso, dois dos fragmentos identificados demonstraram atividade *in vitro* contra as cepas BCG, H37Rv e L5.

Conclusão De nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que identifica moléculas ativas contra a endopeptidase RipA, com algumas já apresentando atividade inibitória contra cepas de referência do complexo MTB.

APOIO FINANCEIRO: FAPESP (2016/18721-4), CNPq (151725/2022-5).

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, cisteína protease, peptidoglicano, *Fragment-based Drug Discovery*.

MEASLES VIRUS MUTATES DURING *IN VITRO* INFECTION OF HUMAN NEURONS

Santos D.¹, Beltrão-Braga P.C.B.^{1,2} Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas ¹Universidade de São Paulo; ²Institut Pasteur de São Paulo

Introdução e Objetivos: Sarampo é uma doença infecciosa causada pelo vírus MeV, resultando em doenças respiratórias e gastrointestinais, erupções cutâneas e imunossupressão a longo prazo. Além disso, o vírus pode persistir no corpo, levando potencialmente ao desenvolvimento de panencefalite esclerosante subaguda (SSPE). O vírus produzido pela infecção neural apresenta mutações nos genes responsáveis pela proteína H e F impedindo seu brotamento e, conseqüentemente, impedindo seu isolamento. Compreender a fisiopatologia do sarampo no cérebro é crucial para desenvolver tratamentos e profilaxias eficazes contra infecções do sistema nervoso central (SNC). **Métodos e Resultados:** Portanto, realizamos uma pesquisa para investigar a fisiopatologia da infecção viral em células progenitoras neurais (NPC) e neurônios. Nossos achados revelaram que tanto NPC quanto neurônios, derivados de células tronco pluripotentes induzidas, são suscetíveis à infecção por MeV. Nas NPC, houve um aumento significativo na carga viral de sobrenadante durante o período de infecção, enquanto nos neurônios a carga viral permaneceu estável sem aumento significativo. Além disso, utilizando TEM, demonstramos visualizamos a formação e brotamento de vírions em NPC e conseguimos uma visualização inovadora de partículas virais completas em neurônios humanos cultivados. Após realizamos o sequenciamento dos vírus gerados a partir da infecção de NPC e neurônios e corroboramos com a literatura demonstrando que *in vitro* o vírus também sofre mutações quando infectam neurônios, contudo nosso achado demonstra uma mutação no gene N, que é a possível causa da baixa taxa de brotamento viral. Análises mostraram um aumento significativo na expressão de MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , M-CSF, GRO- α , IL-6, IL-9, IL-18, RANTES, TNF β , GM-CSF, VEGF, MIF em NPC e em neurônio de MCP-1, MIP-1 β , M-CSF, GRO- α , IL-6, IL-8, IL-18, RANTES, TNF β , TRAIL. **Conclusão:** Em conclusão, compreender os efeitos da infecção por MV nos componentes celulares do cérebro é fundamental para avançar nosso conhecimento sobre infecções do SNC relacionadas ao sarampo. A suscetibilidade observada de NPC e neurônios à infecção por MV destaca a necessidade de estratégias terapêuticas direcionadas para prevenir ou mitigar complicações neurológicas causadas por esse patógeno viral. Além disso, a demonstram de mutações também na infecção *in vitro* de neurônio sugere que a mutação possa ocorrer após a infecção.

Financial Support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Análise Crítica das Políticas de Equidade na Tuberculose no Brasil: Vulnerabilidade e Desafios no Controle da Doença

Ramos, E.M., Guimarães A.M. de S., Departamento de Microbiologia (LAPAM), Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

INTRODUÇÃO: A tuberculose (TB) é uma das principais doenças infecciosas no Brasil, com alta prevalência entre populações vulneráveis, como a população em situação de rua, indivíduos com coinfeção TB-HIV e aqueles em condições socioeconômicas precárias. Apesar dos avanços nas políticas públicas de controle da TB, persistem significativas desigualdades no acesso ao diagnóstico e tratamento, exacerbadas por vulnerabilidades individuais, programáticas e sociais. **OBJETIVOS:** Discutir as dimensões e aspectos abordados na produção acadêmica sobre o tema. **METODOLOGIA:** O estudo abordou a metodologia todo Estado da Arte (EA) para revisar a literatura sobre tuberculose na população em situação de rua no Brasil, abrangendo o período de 2013 a 2023. Utilizou-se o protocolo PRISMA para garantir a qualidade da revisão. A busca foi realizada com descritores como "Tuberculosis", "Mycobacterium Tuberculosis", "Políticas Públicas", "Brasil", "Equidade" e "População em Situação de Rua". Foram incluídos estudos publicados em inglês e português, desde que os termos relevantes aparecessem no título, resumo ou palavras-chaves. **RESULTADOS:** Foram incluídos 11 artigos publicados nos últimos dez anos, abordando vulnerabilidades e políticas de TB no Brasil. Entre as vulnerabilidades individuais, destacaram-se má nutrição (25%), tabagismo (20%), alcoolismo (15%), abuso de drogas (10%), coinfeção TB-HIV (30%), diabetes (10%), câncer (5%). No eixo vulnerabilidades sociais, alta densidade populacional (60%), prevalência de TB na comunidade (50%), pobreza (55%), extrema pobreza (20%) e estigma (30%) foram os fatores mais mencionados. Os resultados indicam que a coinfeção TB-HIV e as condições de vida inadequadas são fatores críticos na incidência da TB. A infraestrutura de saúde deficiente e a má distribuição de recursos dificultam o acesso ao diagnóstico e tratamento adequados, conforme destacado por 40% dos artigos revisados. Além disso a falta de proteção social e o estigma associado à TB prejudicam a adesão ao tratamento, identificados em 35% dos estudos. **DISCUSSÃO:** Os estudos revelam que, apesar dos esforços significativos na implementação de programas de controle da TB, as vulnerabilidades estruturais e sociais continuam sendo grandes obstáculos. A coinfeção TB-HIV aumenta a complexidade do tratamento e piora os desfechos de saúde, exigindo estratégias específicas de manejo clínico e políticas de saúde integradas. A má nutrição e as condições de vida inadequadas evidenciam a necessidade de intervenções que transcendam o setor de saúde, incluindo políticas de segurança alimentar e melhorias nas condições habitacionais. A infraestrutura de saúde deficiente e a má distribuição de recursos revelam a urgência de investimentos sustentáveis no sistema de saúde brasileiro, especialmente em áreas com alta carga de TB. A falta de proteção social e o estigma associado a TB são barreiras significativas para a adesão ao tratamento, sugerindo que políticas de suporte social e campanhas de educação em saúde são essências para melhorar os resultados. **CONCLUSÃO:** Para controlar de forma efetiva a TB no Brasil, é necessário adotar uma abordagem multifacetada que inclua melhorias das condições de vida, o fortalecimento do Sistema Único de Saúde, a implementação de tecnologias avançadas de diagnóstico e promoção de políticas de proteção social. A equidade deve ser princípio norteador das políticas de saúde pública, garantindo que todos os indivíduos, independentemente de sua condição socioeconômica, tenham acesso igualitário ao

diagnóstico, tratamento e cuidados contínuos. A integração de novas tecnologias de diagnósticos e a melhoria das estratégias de vigilância epidemiológicas são necessárias e precisam ser acompanhadas por políticas que abordem as desigualdades socioeconômicas e fortaleçam o Sistema Único de Saúde.

REFERÊNCIAS:

1. Maffaccioli R, Oliveira DLLC de, Brand ÉM. Vulnerabilidade e direitos humanos na compreensão de trajetórias de internação por tuberculose. *Saúde e Sociedade* [Internet]. 2017 [cited 2022 Feb 25];26:286–99. Available from: <https://www.scielo.br/j/sausoc/a/ZCM3KpXXHHc9rXDpBjPjC7C/?lang=pt>
2. Pavinati G, Vinícius L, Trindade A, Gabriela Tavares Magnabosco. Disparidades geoprogramáticas do desempenho de indicadores da tuberculose na população em situação de rua no Brasil: uma abordagem ecológica. *Revista Brasileira De Epidemiologia* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2023 Nov 27];26. Available from: <https://doi.org/10.1590%2F1980-549720230048.2>
3. Zuim RCB, Trajman A. Itinerário terapêutico de doentes com tuberculose vivendo em situação de rua no Rio de Janeiro. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*. 2018 Aug 13;28(2). Available from: <https://www.scielo.br/j/physis/a/mL7w7RW4gFB65zfqGsxzYBy/>
4. Lima DG de, Maciel JM, Silva KN da, Barbosa R de S, Pereira JF, Silva IGB, et al. Determinantes sociais de saúde da população em situação de rua vulnerável à tuberculose. *Enferm foco (Brasília)* [Internet]. 2023;1–7. Available from: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1442925>
5. Maia C, Mauro Niskier Sanchez, Ramalho W, Adelmo Inácio Bertolde, Leonor E. Social determinants of tuberculosis via a zero-inflated model in small areas of a city in Southeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2018 Oct 1;51(5):638–43. Available from: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/GkP7hmv7g5ZBZzgrSDXCxHv/>

ANÁLISE DO PROCESSO DE MUTAGÊNESE POR UV MEDIADO POR POL V_{rumAB} DURANTE A CONJUGAÇÃO DE ICES DA FAMÍLIA SXT/R391. Da Silva, K. C. D., Fonseca, D. L. H., Galhardo, R. S., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos: Dentro da família Y de DNA polimerases propensas a erros capazes de realizar a síntese translesão de DNA, a DNA Pol V (*umuDC*) se faz a principal enzima responsável pelos altos níveis de mutação provocadas por UV durante a resposta SOS em bactérias. Em Elementos Conjugativos e Integrativos (ICEs) da família SXT/R391, esta enzima é codificada pelo operon *rumAB*. A expressão da Pol V_{rumAB} pode conferir capacidade mutagênica por UV e permitir a sobrevivência de bactérias como *P. mirabilis*, naturalmente imutáveis a estas condições. Ademais, já foi reportado a transmissibilidade por conjugação de ICEs possuindo este operon durante condições genotóxicas. Todavia, ainda não foi explorado a extensão mutagênica desta DNA Pol V durante estas condições. Neste trabalho, nós procuramos investigar os requisitos e a atividade mutagênica da Pol V_{rumAB} durante a conjugação em condições de dano no DNA provocados por UV-C.

Métodos e Resultados: Nós realizamos ensaios quantitativos de conjugação usando cepas isogênicas de *P. mirabilis* como doadoras dos ICEs (selvagem e $\Delta rumAB$) e linhagens de *E. coli* com diferentes *backgrounds* genéticos (selvagem, $\Delta umuDC$, $\Delta recA$, $pWSK_{rumAB}$) como receptoras. As doadoras foram irradiadas com diferentes doses de UV-C e incubadas junto às receptoras em filtros de conjugação. Após diluídas e plaqueadas, as transconjugantes, doadoras e receptoras foram quantificadas em CFU/mL. Além disso, foi feito o sequenciamento genômico de transconjugantes e doadoras após a conjugação para identificação de mutações provocadas por UV. Nossos resultados mostraram que os genes *rumAB* contribuem de maneira significativa à conjugação do ICE após danos no DNA por UV, quando presentes nas células doadoras. Ademais, nas células receptoras, RecA mostrou-se um componente que também colabora na conjugação. Quanto ao sequenciamento, nenhuma mutação provocada por UV foi encontrada nas células receptoras ou no ICE recebido após a conjugação; entretanto, identificamos mutações no genoma das doadoras contendo ICE *rumAB*⁺, porém nenhuma se localizava no ICE.

Conclusão: Ao todo, estes resultados mostram que RecA provavelmente é um componente utilizado pelo ICE nas células receptoras, possivelmente pela Pol V_{rumAB} para modificações pós traducional, durante a conjugação. Ademais, apesar da Pol V_{rumAB} participar da conjugação aumentando a transmissibilidade deste elemento móvel após danos no DNA, e, embora mutagênica, esta atividade não afeta a integridade do ICE, o que pode permitir a transmissão deste elemento móvel sem quaisquer mutações.

Apoio financeiro: FAPESP número 2021/15170-5, 2019/19435-3 e 2021/10577-0, e CAPES (código de financiamento 001).

EVOLUTIONARY PATTERNS OF THE WESTERN AFRICAN ZIKA VIRUS USING RECENT STRAINS

Cunha, M.P. ^{1,2}, Dieng, I. ³, Mazur, F. ⁴, Pour, S.Z. ¹, Diagne, M.M. ³, Prudhomme, J. ³, Fall, C. ³, Diallo, D. ⁵, Ndiaye, E.H. ⁵, Gaye, A. ⁵, Diallo, M. ⁵, Faye, O. ³, Freire, C.C.M. ⁴, Simon-Lorière, E. ⁶, Sall, A.A. ³, Faye, O. ³, Zanotto, P.M.A. ¹

1. Laboratory of Molecular Evolution and Bioinformatics, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.
2. Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil.
3. Virology Department, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Senegal.
3. Department Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, Brazil.
5. Medical Zoology Department, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Senegal.
6. G5 Evolutionary Genomics of RNA Viruses, Institut Pasteur, Université Paris Cité, Paris, France.

Introduction and Objectives

Zika virus is an emerging mosquito-borne virus of concern for public health, but very little is known about its transmission patterns and ecology, especially in African countries. Considering the evolutionary and epidemiological importance of ZIKV studies, particularly considering the African genotype circulation, here we aimed to evolutionarily describe and characterize eleven ZIKV sequences collected in Senegal from 2011 to 2015. To holistically understand the phylogenetic relationship, we integrated our sequences with a dataset of sequences available on public databases.

Methods and Results

This study used virus strains from the Institut Pasteur in Dakar collection, obtained from mosquitoes collected in the Kedougou region of southeastern Senegal (four sequences from 2011 and seven sequences from 2015). The strains were cultured in AP61 and Vero cells, and cytopathic effects were monitored daily. For viral genomic sequencing, two strategies were used: (i) direct RNA sequencing, and (ii) enrichment by RT-PCR. In the enrichment protocol, specific primers were designed to amplify the West African Lineage of the Zika virus, RNA was extracted and detected by RT-qPCR, followed by cDNA synthesis and amplification. Libraries for next-generation sequencing were prepared, and complete genomic sequences were obtained, analyzed phylogenetically, and used for phylogeographic studies and codon usage analysis to explore the adaptation of the strains to the urban cycle of transmission. All new genomes are part of the African genotype, within the virus lineage previously characterized as the Western Lineage. Sequences were strongly clustered by sampling location and date of the collection respectively, suggesting a highly focal geographical and temporal distribution. Our phylogeographic reconstructions indicated that the African genotype of the Zika virus Western African Lineage emerged in the Western part of Africa mostly following an East-to-West migration pattern. The analyses further revealed that the African genotype of the Zika virus was likely introduced in Western Africa between 1957 and 1974. Since the emergence of the Zika virus in Western Africa, we found a decrease in the effective population size of the Zika virus Western Africa Lineage, but stagnating in recent years in the Kedougou region. Over time, no significant increase was recorded in the CAI values for *Aedes aegypti* and *Homo sapiens*.

Conclusions

In summary, the integrated results indicate that the African genotype ZIKV continues to circulate in forest areas, using sylvatic mosquitoes as vectors in Western Africa, with a long period of persistence at a local scale, with an accumulation of diversity over time, and without any evidence of adaptation based in CAI values to the urban environment.

Financial Support

This work was supported by the Action Concertées Inter Pasteuriennes (ZikAe project #ACIP A-15-2014), and by the Fiocruz/Pasteur/USP (grant #314502).

Análise genômica comparativa da mutagênese induzida por UV-C em *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*

Oliveira, R.S, Galhardo, R.S.

Laboratório de Genética Molecular Bacteriana, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

Introdução e Objetivos:

Pseudomonas aeruginosa, um patógeno oportunista, utiliza um mecanismo de resposta a danos no DNA, a resposta SOS, que pode induzir mutações conferindo resistência. Agentes genotóxicos, como antibióticos fluoroquinolonas e radiação UV, podem causar lesões no DNA, levando à formação de DNA de fita simples (ssDNA). Isso ativa a proteína RecA, desencadeando a auto-clivagem de LexA, o repressor do regulon SOS. Consequentemente, os genes SOS ficam disponíveis para transcrição, incluindo aqueles que codificam polimerases propensas a erros responsáveis por introduzir mutações no genoma. No entanto, pouco se sabe sobre a extensão dessas mutações em um contexto genômico. Nosso projeto visa utilizar o sequenciamento do genoma completo após experimentos de indução de mutagênese por UV para analisar os efeitos dos danos no DNA em comparação com *Escherichia coli*, que apresenta uma alta taxa de mutagênese induzida por danos no DNA, ao contrário de *P. aeruginosa*.

Métodos e Resultados:

Nossos resultados sugerem que a mutagênese induzida por UV em *P. aeruginosa* é significativamente menor em comparação com *E. coli*, conforme demonstrado pelas mutações de resistência à rifampicina. Além disso, enquanto outros genes regulados pelo SOS em *P. aeruginosa* foram inicialmente hipotetizados como interferentes na mutagênese, os resultados experimentais não mostraram diferenças significativas. O sequenciamento do genoma completo de cepas de *E. coli* expostas ao UV resultou em uma frequência mais alta de mutações, principalmente mutações características induzidas por UV. As mutações foram distribuídas uniformemente pelo genoma, diferindo de achados anteriores em outras bactérias.

Conclusão:

Nosso estudo fornece entendimento sobre os mecanismos mutagênicos em *P. aeruginosa* e *E. coli* após exposição ao UV, lançando luz sobre os diferentes graus de mutabilidade entre bactérias com diferentes vias de síntese translesão. Esses achados têm implicações para a compreensão da evolução bacteriana, biotecnologia, resistência a medicamentos e engenharia genética. Análises adicionais são necessárias para caracterizar compreensivamente os padrões de mutação e suas localizações genômicas.

Apoio Financeiro: FAPESP

EFEITO ANTIFÚNGICO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARREGADAS DE TERBINAFINA NO TRATAMENTO DE DERMATOFITOSE

CAVALCANTE, S.B.¹, LOPES, L.B.², ISHIDA, K.¹

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil

²Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil

As doenças de pele estão entre as condições de saúde mais comuns que afetam pelo menos um terço da população mundial. Dermatofitos, agentes das dermatofitoses, são fungos altamente infecciosos que afetam pele, cabelos e unhas e são comumente tratadas com antifúngicos orais ou tópicos. O crescente número de casos de infecções fúngicas causadas por dermatofitos combinado com o elevado número de falhas no tratamento e recidivas, a dermatofitose tornou-se um grande problema de saúde. Neste estudo, desenvolvemos nanopartículas poliméricas (NP) para disponibilidade cutânea e redução da frequência de administração de terbinafina no tratamento de dermatofitoses. As nanopartículas poliméricas de policaprolactona (PCL) foram obtidas pela técnica de nanoprecipitação para encapsulamento de terbinafina (TRB). O diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta de nanopartículas vazias (PCL) e carregadas com TRB (PCL-TRB) foram determinados por dispersão dinâmica de luz e a eficiência de encapsulamento usando cromatografia líquida de alta eficiência. A atividade antifúngica das NPs (PCL e PCL-TRB) e TRB livre foi testada pelo método de microdiluição em caldo contra *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 e *Nannizzia gypsea* ATCC 14683. A toxicidade foi avaliada usando um modelo larvário de *Galleria mellonella*. PCL-TRB apresentou tamanho nanométrico ($199,2 \pm 0,6$), potencial zeta negativo ($-17,4 \pm 1,4$ mV), baixa polidispersidade ($0,28 \pm 0,15$), alta eficiência de encapsulamento ($>98\%$) e estabilidade por 60 dias. As nanopartículas de PCL-TRB foram consideradas seguras devido aos altos índices de saúde e à ausência de mortes de larvas de *G. mellonella*. TRB em nanopartículas de PCL apresentou atividade inibitória e efeito fungicida sobre *T. mentagrophytes* a $0,01 \mu\text{g/mL}$ e *N. gypsea* a $0,125 \mu\text{g/mL}$. O fármaco em solução apresentou resultados semelhantes, indicando que o encapsulamento não prejudicou o efeito antifúngico da TRB. Estes resultados demonstram um sistema nanocarreador promissor para o tratamento de dermatofitoses, destacando a possibilidade de um tratamento local e menos invasivo. O encapsulamento da TRB no nanocarreador polimérico pode contribuir para a eficácia e menor frequência de administração.

Palavras-chaves: Antifúngico, dermatofitos, micose, nanopartícula, policaprolactona, terbinafina.

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 306041/2022-7)

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF ORF *YJR124C* IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Oliveira, T.F., Ferreira-Junior, J.R., Barros, M.H., Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introduction and Objectives

Saccharomyces cerevisiae, commonly known as baker's yeast, is a model organism extensively used in molecular and cellular biology due to its relatively simple eukaryotic structure, well-characterized genome, and ease of genetic manipulation. The genome of *S. cerevisiae*, composed of 16 chromosomes and approximately 6,000 genes, was one of the first eukaryotic genomes to be fully sequenced in 1996. Despite significant advances, some genes remain uncharacterized, including the ORF *YJR124c* on chromosome X. Preliminary studies suggest this ORF encodes a vacuolar membrane protein induced under calcium scarcity. This study aims to perform molecular and functional characterization of ORF *YJR124c* in *Saccharomyces cerevisiae*.

Methods and Results

Bioinformatic analyses and phenotypic tests were performed. Bioinformatic analyses predicted the topology of Yjr124c, identifying 12 transmembrane segments and a central cavity typical of MFS transporters. Critical residues, such as aspartic and glutamic acids, were found at the presumed binding site, suggesting interactions with substrates or metal ions. Homologs of Yjr124c were identified in other organisms, such as *Candida albicans*, associated with antifungal resistance. GFP fusion and fluorescence microscopy were used to determine cellular localization. Phenotypic tests involved yeast strains with deletion, overexpression, and mitochondrial targeting of Yjr124c. Fluconazole resistance assays were conducted at various concentrations. Growth assays in YPD and YPEG media, supplemented with metals like copper, manganese, and zinc, were used to evaluate the influence of *YJR124c* on metal homeostasis.

The GFP-Yjr124c fusion revealed a predominantly vacuolar localization, with fluorescence also observed around the cell. In phenotypic tests, the absence of *YJR124c* increased sensitivity to fluconazole. Overexpression of *YJR124c*, on the other hand, was deleterious. Mitochondrial localization of Yjr124c did not significantly impact resistance at low fluconazole concentrations but improved resistance at 40 µg/mL. Metal tests showed that deletion of *YJR124c* increased resistance to copper in YPD and YPEG media, and to zinc in YPEG, but increased sensitivity to manganese in YPD media. Overexpression of *YJR124c* conferred increased sensitivity to copper in both media but improved resistance to manganese only in YPEG. Mitochondrial localization of Yjr124c influenced resistance to manganese and copper.

Conclusion

The results of this study provide an initial understanding of the function of ORF *YJR124c* in *Saccharomyces cerevisiae*, suggesting that Yjr124c is a vacuolar transporter that plays an important role in fluconazole resistance, metal homeostasis, and oxidative stress response.

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

MURINE ANTIBODY 4B1D3 EXHIBITS BROAD NEUTRALIZING ACTIVITY AGAINST SARS-COV-2 VARIANTS AND PROTECTS MICE AGAINST LETHAL CHALLENGE

Authors: Silva, M.O.^{1*}, Daher, I.P.^{2*}, Ibrahim C.H.O.^{1*}, Azevedo, I.R. ^{1*}, Postol, E.², Alencar, R.E.², Silva, G.A.S.¹, Yamamoto, M.M.¹, Almeida, B.S.¹, Koike, G.¹, Souza, E.E.¹, Wrenger, C.¹, Cunha-Neto, E.², Kalil, J.² and Boscardin S.B.¹

¹ Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

² Heart Institute of the Hospital das Clínicas of the Faculty of Medicine of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Introduction and Aim The emergence of the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in late 2019, which triggered the COVID-19 pandemic, has significantly impacted vaccination and public health policies. Although the disease is now under control, the global spread of new variants has led to resistance to previously developed monoclonal antibodies (mAbs) and decreased vaccine efficacy, highlighting the need for broad-spectrum therapeutic and preventive measures. In our study, we generated mAbs from mice immunized with SARS-CoV-2 Wuhan Spike protein using hybridoma technology. We selected anti-Spike mAb-producing clones and characterized a panel of four mAbs to evaluate their potential as antiviral agents and tools for research and diagnostics.

Methods and Results: Our results showed that all mAbs recognized the SARS-CoV-2 Wuhan strain in infected cells via immunofluorescence analysis. Additionally, the binding profiles of the mAbs against the receptor binding domain (RBD) from SARS-CoV-2 variants revealed binding to the Beta, Gamma, and Delta strains. Among these, a mAb named 4B1D3 demonstrated the most promising features, exhibiting broad binding and neutralizing activity against all analyzed SARS-CoV-2 variants, including Omicron BA.2, BA.4/5 and XBB.1.5. Furthermore, prophylactic administration of 4B1D3 mAb protected K18-hACE2 mice against a lethal challenge with SARS-CoV-2 Wuhan strain.

Conclusion: Overall, these mAbs represent valuable tools for research and diagnostics and hold potential for the development of new therapies against SARS-CoV-2 variants.

Supported by: FAPESP 2014/50890-5, CNPq 465434/2014-2, CAPES finance code 01 and FINEP 01.20.0009.00.

CHARACTERIZATION OF A GENE ESSENTIAL FOR *PLASMODIUM BERGHEI* FERTILIZATION

Morosini, L. G., Borges, M. H., Bargieri, D. Y., Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences – USP

Introduction and objectives: Malaria eradication requires new strategies of control. Targeting the different parasite stages is imperative, and impeding human to mosquito parasite transmission will be key for eradication. Among the important innovations needed are Transmission Blocking (TB) strategies to target the parasite sexual stages and prevent mosquito infection, preventing community spread. Few TB targets are known and well described, and only three are currently in clinical development. The identification of parasite proteins important for transmission is critical for the development of new TB strategies, such as vaccines or chemotherapy. **Methodology and results:** Here, we used the *P. berghei* model and reverse genetics to investigate the role in *Plasmodium* fertilization of a gene with higher expression in gametocytes than in asexual stages. We show that the gene is involved in ookinete formation in vitro and is essential for gamete fertilization and zygote formation. **Conclusion:** We report the characterization of the knockout and the initial evaluation of the antigenic potential of the recombinant protein based on the target sequence as a TB vaccine.

Financial support: FAPESP, CAPES, CNPq.

UNRAVELING THE MOBILOME OF NON-MODEL TRYPANOSOMATIDS USING A PHYLOGENOMIC FRAMEWORK

Tullume-Vergara PO¹, Ludwig A², Peona V³, Teixeira MM¹, Shaw JJ¹, Alves JMP¹. 1. Department of Parasitology, Institute for Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo 05508-000, SP, Brazil. 2. Department of Evolution, Ecology, and Behaviour, University of Liverpool, Biosciences Building, Crown Street, Liverpool, L69 7ZB, UK. 3. Department of Organismal Biology – Systematic Biology, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, SE-752 36, Sweden. Swiss Ornithological Institute Vogelwarte, Sempach, CH-6204, Switzerland Department of Bioinformatics and Genetics, Swedish Natural History Museum, Stockholm, Sweden.

Introduction and objective

Transposable elements (TEs) have the ability to move and amplify inside the host genome, in consequence, these are a pivotal source of genome plasticity. Trypanosomatid parasites are mostly monoxenous species which usually have small genomes, being an interesting parasite set to understand the relation between TEs and genomic evolution. Presently, only four TE clades have been identified in trypanosomatids, which are classified under Class I retrotransposons. Specifically, *Ingi* and *CRE* clades belong to the LINE order, while *VIPER* and *TATE* are associated with DIRS elements. We conducted prediction, annotation and classification of repeat content across the whole genome of 57 trypanosomatids shedding light on the proportions, diversity and dynamic of TEs using a phylogenetic framework.

Methods and Results

Our analysis yielded ~600 TEs consensus sequence models across the dataset. After an exhaustive manual curation process 214 sequences were confirmed of trypanosomatid TEs library. Notably, we also observed instances of burst events, particularly within the *Vickermania*, *Lafontella* and *Herpetomonas* genera. The TE abundance ranged from 0.03 to 16.45 % in the 57 mobilomes. The genome size and transposable elements were weakly correlated, but not significant. We also constructed a phylogenetic tree for the 57 trypanosomatid species based on a supermatrix approach, employing the Maximum Likelihood method.

Conclusion

We compiled a species-specific library intended to aid the trypanosomatid research community in improving the TEs annotation process. This study demonstrates that four families of the trypanosomatids have colonized from monoxenous early stages to dixenous parasites. This comprehensive examination of TEs landscapes contributes significantly to our understanding of the evolutionary dynamics shaping the genomes of trypanosomatids.

Financial support

POTV was supported by the Brazilian National Council of Scientific and Technological Development - CNPq (140430/2021-0).

ATE1 ACTIVATES ER-STRESS AND UPR PATHWAYS IN GLIOBLASTOMA

J., Macedo-da-Silva¹, S.M., Oba-Shinjo², L., Rosa-Fernandes³, R.S., Soares², A.M., Lerario⁴, I.F., Moretti², T.S., Laurentino², R.C., Cintra⁵, A., Lee³, S.K.N., Marie^{2*} and G., Palmisano^{1,6*}

1. GlycoProteomics Laboratory, Department of Parasitology, ICB, University of São Paulo, Sao Paulo, Brazil

2. Laboratory of Molecular and Cellular Biology (LIM 15), Department of Neurology, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

3. Centre for Motor Neuron Disease Research, Faculty of Medicine, Health & Human Sciences, Macquarie Medical School, Sydney, Australia

4. Department of Internal Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA

5. Centro de Investigação Translacional em Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo, Brazil; Department of Radiology and Oncology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

6. School of Natural Sciences, Macquarie University, Sydney, Australia.

* these authors jointly directed this work.

To whom correspondence should be addressed: Prof. Giuseppe Palmisano, Glycoproteomics Laboratory, Department of Parasitology, ICB, University of São Paulo, Brazil, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 05508-900 - São Paulo – SP – Brazil, Tel: + 55-11-99920-8662, palmisano.gp@gmail.com, palmisano.gp@usp.br

Abstract

Post-translational modifications (PTMs) are critical regulators of cancer processes including cell migration, adhesion, and proliferation. Among these, N-terminal protein arginylation is emerging as a significant PTM in tumor progression, though its mechanisms and effects can vary by cancer type. Glioblastoma (GBM), an aggressive brain tumor with poor prognosis and high recurrence rates, was used here as a focal point for understanding these mechanisms. In this study, we combined *in silico* analyses, *in vitro* experiments, and patient sample evaluations to investigate the role of N-terminal protein arginylation in GBM. Using RNA sequencing, proteomics, immunofluorescence, and immunoblotting on U87MG and T98G cell lines, we assessed the impact of arginylation on GBM pathology. Our findings revealed a distinct arginylation pattern in GBM tissues compared to non-neoplastic brain tissues. Notably, upregulation of the arginylation enzyme ATE1 correlated with increased tumor cell proliferation. Additionally, we observed a pronounced activation of the unfolded protein response (UPR) pathway in association with elevated ATE1 levels, leading to

autophagy rather than apoptosis. These results highlight protein arginylation as a crucial mechanism driving GBM growth, with autophagy-mediated substrate recycling enhancing tumor cell fitness.

Keywords: Glioblastoma, ATE1, arginylation, ER-stress, UPR pathway, Autophagy, Proteomics

Acknowledgments

We are grateful for the financial support provided by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, grants processes n° 2018/18257-1 (GP), 2018/15549-1 (GP), 2020/04923-0 (GP), 2021/00140-3 (JMDS), 2021/01207-4 (TSL) 2020/02988-7 (SKNM, SMOS); 2015/26722-8 (CW), 2020/12277-0 (EES), 2020/06409-1 (ELD); by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (“Bolsa de Produtividade” (SMOS, SKNM and GP); by Fundação faculdade de Medicina (FFM-SKNM); by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES bolsa PNPd to LRF, #88887.600107/2021-00 to IFM)).

ANÁLISE PROTEÔMICA URINÁRIA DE MILITARES EXPOSTOS À RABDOMIÓLISE INDUZIDA POR ESFORÇO FÍSICO COM LESÃO RENAL AGUDA. Santos-Donado¹, P.R.; Lazari¹, L.C.; Mule¹, S.N.; Marques Neto¹, A. M.; Angeli¹, C.B.; Viana-Gomes², D.; Lucena², C.V.; Moreira³, J.C.; Kirsztajn⁴, G.M.; Pesquero⁵, J.B.; Pereira⁶, M.D.; Carneiro⁷, A.; Palmisano¹, G. ¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP; ²Departamento de Corrida, Escola de Educação Física e Esporte, UFRJ; ³Centro de Ecologia Humana e Saúde do Trabalhador, Fundação Oswaldo Cruz; ⁴Departamento de Medicina, Nefrologia, UNIFESP; ⁵Departamento de Biofísica, UNIFESP; ⁶Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ; ⁷Marinha do Brasil, Centro de Educação Física Almirante Adalberto Nunes.

Introdução e Objetivos: A rabdomiólise induzida por esforço físico (RME) é definida como o processo de lesão e ruptura das células musculares, resultando na liberação do seu conteúdo na corrente sanguínea após treinamento intenso. A lesão renal aguda (LRA) é uma complicação potencialmente fatal da RME. Evidências sugerem que indivíduos saudáveis e em boa forma física podem desenvolver RME e LRA associada, como observado em militares. As manifestações típicas incluem dor muscular e mioglobinúria, causando urina escura. A creatina quinase (CK) é utilizada para diagnóstico da RME, embora discrepâncias entre os níveis de CK e os sintomas clínicos tenham sido relatadas. Para abordar essas limitações, avaliamos o proteoma urinário como uma ferramenta para prever a RME e LRA. Uma análise integrativa utilizando MALDI-TOF e nLC-MS/MS foi realizada para investigar a proteômica urinária diferencial de militares submetidos a treinamento intenso e prolongado.

Métodos e Resultados: Dezenove soldados da Marinha do Brasil matriculados em Programa de Treinamento Especial foram recrutados. Amostras de urina foram coletadas em quatro períodos: basal (T1), pós-exercício (T2), pré-escape (T3) e recuperação de 7 dias (T4) e classificadas em dois grupos: LRA (lesão renal aguda, estágio Delta-Creatinina 1, sCr $\geq 0,3$ mg/dL) e não-LRA (sCr $< 0,3$ mg/dL). Um total de 20 μ g de proteína urinária foram purificadas usando coluna C18 e aplicadas diretamente na placa de MALDI, usando uma solução matriz HCCA. As amostras foram analisadas em MALDI-TOF Autoflex (Bruker Daltonics). Para 1-DE, 20 μ g de proteína foram resolvidas por SDS-PAGE. As bandas de T2 foram excisadas na faixa de PM 8–15 kDa, correspondendo aos picos discriminantes de "m/z" e submetidas à digestão com tripsina em gel, seguida de análise em nLC-MS/MS, utilizando um Easy nano LC1000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado ao LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). O pré-processamento dos dados de MALDI-TOF foi realizado usando pacotes ClinProTools e R, com espectros entre 2,5–15 kDa. Os dados brutos de nLC-MS/MS foram analisados por MaxQuant e processados com Perseus. A combinação de 1-DE e nLC-MS/MS no T2 identificou 589 proteínas, das quais 25 foram diferencialmente reguladas. Dentre elas, sete proteínas foram superexpressas e 18 diminuídas para o grupo LRA em comparação ao grupo não-LRA. A análise proteômica urinária revelou a superexpressão de proteínas associadas a danos musculares e renais, incluindo a Proteína de ligação de ácidos graxos, coração (FABP3); Acilfosfatase-2 (ACYP2); Proteína de ligação ao fator de crescimento insulínico 1 (IGFBP1); Mioglobina (MB); Proteína deglicase DJ-1 (PARK7); Dismutase de superóxido [Cu-Zn] (SOD1) e Timosina beta-4 (TMSB4X). Estas proteínas representam potenciais biomarcadores urinários para RME e LRA resultantes de exercício intenso.

Conclusão: O proteoma urinário permitiu o monitoramento das mudanças fisiopatológicas de forma não invasiva, proporcionando uma melhor compreensão sobre o mecanismo da RME e IRA durante o treinamento militar.

Apoio Financeiro: Os autores agradecem à Marinha do Brasil (Diretoria Geral de Desenvolvimento Nuclear e Tecnológico da Marinha, Comando Geral do Corpo de Fuzileiros Navais, Hospital Naval Marcílio Dias, Instituto de Pesquisas Biomédicas da Marinha, Centro de Instrução Almirante Sylvio de Camargo) pelo suporte à pesquisa e disponibilizar as instalações. Agradecemos também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processos 2021/00140-3; 2018/18257-1; 2018/15549-1; 2018/13283-4; 2020/04923-0 e 2014/27198-8), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processos 425025/2021-7 e 381841/2023-5), à Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ, APQ1, E-26/010001697/2019) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro deste estudo.

DIGESTÃO TRIPSÍNICA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ASSISTIDA POR MICROONDAS

de Toledo, T. M.¹, Neto, A. M. M.¹, Mule, S. N.¹, Santos-Donado, P. R.¹ Angeli, C. B.¹, Palmisano G.^{1,2*}

¹Laboratório de Glicoproteômica, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil;

²School of Natural Sciences, Macquarie University, Sydney, Australia.

* Autor correspondente | E-mail: palmisano.gp@usp.br (GP)

Introdução e Objetivos: As últimas décadas asseguraram a importância das terapias biológicas, especialmente os anticorpos monoclonais (mAbs), que demonstraram eficácia em tratamentos promissores para doenças como câncer, reposição hormonal, vacinas e muitas outras. Como os mAbs possuem muitas modificações pós-traducionais (PTMs) cruciais para a estrutura e função correta da proteína, a análise de múltiplos atributos ganhou atenção como um novo e necessário controle de qualidade para a indústria. A preparação de amostras de proteínas, embora eficaz, é um processo laborioso, limitado e que consome tempo, abrangendo pelo menos uma hora e meia para redução e alquilação da proteína antes da digestão com tripsina durante a noite (aproximadamente 16 horas). Além disso, a estrutura da proteína pode ser alterada quimicamente durante esses processos, dificultando a análise correta da estrutura nativa do biofármaco. Assim, o estudo de metodologias mais rápidas e simples que interfiram menos na estrutura da proteína são de grande importância para a indústria biofarmacêutica. O uso de microondas é uma estratégia comum para acelerar a taxa de reações bioquímicas, com essa característica em mente, buscamos testar o uso de microondas para auxiliar na digestão com tripsina de anticorpos monoclonais. **Métodos e Resultados:** Utilizamos uma proteína conhecida, a albumina de soro bovino (BSA) para validar a digestão com tripsina assistida por microondas, e a melhor condição também foi testada em IgG comercial de soro humano. A proteína única foi reduzida com DTT ou TCEP a 100°C por 10 minutos e alquilada com IAA ou CAA por 30 minutos a 30°C, seguida de precipitação com clorofórmio-metanol e digestão tripsínica de 10 minutos. Os dados brutos foram então analisados com o MaxQuant, permitindo 4 clivagens perdidas. Todos os dados resultantes do MaxQuant foram analisados com Python (pandas, numpy, matplotlib, seaborn, scipy.stats, functools) e condensados em um único arquivo contendo todos os peptídeos modificados e não modificados. Esses dados foram analisados comparando o z-score de todas as intensidades e contagens normalizadas para modificações identificadas em todas as condições testadas. Peptídeos também foram analisados estatisticamente através de um teste t para PTMs específicas de interesse. **Conclusão:** Nossa metodologia demonstrou que a digestão com microondas por 10 minutos tem uma melhor cobertura de sequência em comparação com a abordagem durante a noite, bem como uma intensidade de PTMs semelhante, mas quantitativamente menos peptídeos modificados. **Apoio Financeiro:** Agradecemos ao BIOMASS (CEFAP-USP) pelas análises de LC-MSMS; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos processos de concessão nº 2018/18257-1 (GP), 2018/15549-1 (GP), 2020/04923-0 (GP), 2022/11334-6 (GP), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (“Bolsa de Produtividade” - PROEX), (TMT, AMMN, GP) pelo apoio financeiro.

ST8Sia2: The host's magical shield against *Trypanosoma cruzi* infection. Barboza¹, B.R.; Macedo-da-Silva¹, J.; Trajano-Silva¹, L.A.M.; Gomes¹, V.M.; Santos¹, D.M; Marques-Neto¹, A.M.; Mule¹, S.N; Angeli¹, C.A.; Borsoi², J.; Moraes³, C.B; Moutinho-Melo^{4,5}, C.; Mühlenhoff⁶, M.; Colli⁷, W.; Marie⁸, S.K.N.; Pereira², L.V.; Manso-Alves⁷, M.J.; Palmisano^{1,9}, G. ¹GlycoProteomics Laboratory, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil; ²Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo, Brazil; ³Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil; ⁴Laboratory of Vaccine Development, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil; ⁵Laboratory of Immunological and Antitumor Analysis, Department of Antibiotics, Bioscience Center, and Keizo Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ⁶Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, Germany; ⁷Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, Brazil; ⁸Laboratory of Molecular and Cellular Biology (LIM 15), Department of Neurology, School of Medicine, University of São Paulo, Brazil; ⁹School of Natural Sciences, Macquarie University, Sydney, Australia.

Introduction and Objectives: Glycosylation is a structurally and functionally diverse co- and post-translational modification process in cells, characterized by the addition and removal of glycans to proteins and lipids. In mammals, the polysialyltransferase ST8Sia2 repeatedly adds sialic acid units to form polysialic acid (polySia), a modification with well-documented roles in the nervous system. However, the role of polySia in infection is poorly understood. This study investigates the role of host polySia during *T. cruzi* infection, a parasite that causes Chagas disease, which affects millions globally. The study aims to define how *T. cruzi* alters host polysialylation and to explore the potential of targeting host polysialylation as a therapeutic strategy against infection. **Methods and Results:** A combination of *in silico* and experimental tools was used to assess host polysialylation during *T. cruzi* infection. We analyzed the expression of ST8Sia2 and polysialylation levels in host cells infected with *T. cruzi*. Our results indicate that *T. cruzi* infection significantly reduces ST8Sia2 expression and decreases polysialylation levels in host cells. Key proteins, including NCAM1 and SCN5A, were affected by this reduction. Inhibition of ST8Sia2, whether chemically or genetically, resulted in an increased parasite load in mammalian cells. Furthermore, the modulation of host polysialylation induced oxidative stress, creating an environment that favored *T. cruzi* survival and infection. **Conclusions:** These findings suggest a critical protective role of ST8Sia2-mediated polysialylation against *T. cruzi*. This study highlights the significance of ST8Sia2 and host polysialylation in defending against *T. cruzi* infection. And provide a novel perspective on Chagas disease mechanisms and suggest that enhancing host polysialylation could serve as a therapeutic approach to bolster cellular defenses against *T. cruzi* and potentially other pathogens. **Financial support:** FAPESP; CNPq; CAPES.

GENOMIC SURVEILLANCE OF *Plasmodium falciparum* ON AMAZON REGION USING CUSTOM-TARGETED AMPLICON SEQUENCING

Dombrowski, J.G.^{1,2}, de Jesus, M.C.S.², Gomes, L.C.¹, Phelan, J.E.², Clark, T.G.^{2,3}, Campino, S.², Marinho, C.R.F.¹

1 Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; 2 Faculty of Infectious & Tropical Diseases, London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, United Kingdom; 3 Faculty of Epidemiology and Population Health, London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, United Kingdom

Introduction and Objectives: The resistance of *P. falciparum* (*Pf*) to commonly used antimalarials such as chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and mefloquine is a long-standing issue. The main treatment for uncomplicated *Pf* malaria is artemisinin-based combination therapies (ACTs), but reports of artemisinin resistance have emerged in recent years. The mechanisms behind the acquisition of resistance to antimalarials are complex, but genetic mutations in key genes play a significant role. Large-scale genomic studies are still scarce in Brazil, making our objective to study the genes of resistance to antimalarial drugs in the Juruá region of utmost importance.

Methods and Results: A multiplex PCR protocol was developed and optimised for the genetic study of the parasite and subsequent sequencing using the Nanopore/MinION platform. This protocol focused on five antimalarial drug resistance genes for *Pf* (CRT, DHFR, DHPS, MDR-1, KELCH13). For this purpose, 216 samples infected with *P. falciparum* from the Juruá region, state of Acre, were collected in two periods (2013/2014 and 2020/2021). In these samples, a high frequency (90.5%) of triple mutations were identified in the CRT gene (Lys76Thr and Cys72Ser) and MDR-1 (Tyr184Phe), indicating resistance to chloroquine and lumefantrine. This result was expected since it is known that chloroquine-resistant *Pf* has been spreading around the world for many years. There was also a high frequency (81.6%) of double mutations in the DHFR gene (Asn51Ile and Ser108Asn), indicating resistance to pyrimethamine, as well as a triple mutation (91.6%) in the DHPS gene (Ala437Gly, Lys540Glu and Ala581Gly), indicating resistance to sulphadoxine. In these preliminary analyses, no mutations were observed in the K13 gene, which would indicate artemisinin resistance.

Conclusion: Our study underscores the urgent need for effective surveillance of the parasite population to prevent the emergence and spread of new genetic variants. The threat of artemisinin resistance, which was first reported in Southeast Asia and is now potentially spreading to South America, including Guyana and Suriname, near the border with Brazil, is a serious concern. Continued monitoring for antimalarial drug resistance is crucial to prevent the spread of artemisinin resistance, which could significantly impede malaria elimination efforts.

Financial support: FAPESP

IMPACT OF MALARIA ON THE CARDIOVASCULAR SYSTEM IN A BRAZILIAN ENDEMIC

AREA

Gomes, L. C.^{1*}; Lima, K.O.²; Brainin, P³; Holm, A. E.³; Vieira, I. V. M.²; Evangelista, M. V. P.²; Matos, L. O.²; Lopes, B. V. R.⁴; Silva, I. F. V. O.²; Ramalho, L. O. P. V. N.⁴; Santos, M. I.¹; Dombrowski, J.¹; Carvalho Junior, A. R.¹; Peixoto, E. P. M.¹; Wegener, A.³; Chagas, E. H. N.¹; Wunderlich, G.¹; Souza, R. M.²; Biering-Sørensen, T.^{3,5}; Silvestre, O. M.⁴; Marinho, C. R. F.^{1#}

- 1) Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
- 2) Multidisciplinary Center, Federal University of Acre, Campus Floresta, Cruzeiro do Sul, Acre, Brazil
- 3) Department of Cardiology, Herlev-Gentofte University Hospital, Hellerup, Denmark
- 4) Health and Sport Science Center, Federal University of Acre, Rio Branco, Acre, Brazil
- 5) Faculty of Biomedical Sciences, Copenhagen University, Copenhagen, Denmark

*E-mail: lauracg.gomes@gmail.com

#E-mail: marinho@usp.br

Background: The ways in which malaria can impact the cardiovascular system are not well elucidated yet. Parasite presence may cause direct cardiac damage, but also lead to cardiovascular complications because of persistence of endothelial dysregulation in ongoing infections. We aimed to investigate the effects of malaria on the cardiovascular system in a Brazilian malaria-endemic area assessing endothelial activation and cardiac markers. **Methods:** The study was conducted in the western Brazilian Amazon from June 2020 to August 2021. A total of 115 patients with malaria (qPCR positive for *P. vivax* or *P. falciparum*) were included in the analyses. Eighty-five of these patients were examined in a follow-up evaluation (FUP) 34 days later (IQR 28 to 37.5) in which all of them were negative for *Plasmodium* spp. A selection of 39 controls (patients with no malaria) matched with the malaria patients by age, sex, as well as presence of IgM for SARS-CoV-2 and for dengue virus was used to compare with the FUP results. **Results:** In patients with malaria, all assessed endothelial markers, except P-selectin, were significantly elevated in the first time-point under infection compared with their FUP sample [angiopoietin-1 (p<0.0001); ICAM-1 (p<0.0001); L-selectin (p<0.002); thrombomodulin (p<0.001); vWF-A(p<0.001); angiopoietin-2 (Ang-2; p<0.001); E-

selectin ($p < 0.001$); VCAM-1 ($p < 0.0001$); P-selectin ($p = 0.090$)]. A marker of heart failure, NT-proBNP ($p < 0.001$), as well as myocardial injury markers, troponin I ($p = 0.048$) and HFABP ($p < 0.001$), also had increased levels at enrollment compared with FUP. Only Ang-2 ($p = 0.040$) was persistently elevated in FUP in relation to controls. **Conclusion:** Despite all the endothelial activation biomarkers decreased their levels in the FUP, Ang-2 remained above controls. Elevated Ang-2 levels are associated with increased vascular stiffness and hypertension. Therefore, the persistence of this marker may have consequences for blood pressure. The higher levels of cardiac markers at the first time-point suggest that malaria causes changes, although apparently temporary, in heart tissues. More studies are necessary to clarify whether these marker alterations have long-term clinical relevance.

Funding: CNPq (142306/2020-7), FAPESP (2022/13150-0; 2021/13950-3)

Rayssa Scabio de Moura

Projeto de pesquisa: Técnicas do genoma do tipo PGT-A para sucesso de gestação.

INTRODUÇÃO: O **Diagnóstico Genético Pré-Implantacional** (PGT ou PGD) *Pre-implantation Genetic Diagnosis* é o procedimento utilizado após as técnicas de fertilização *in vitro* (FIV) ou a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), para a obtenção do embrião saudável. O PGT permite o estudo de alterações genéticas e cromossômicas no embrião durante diferentes estágios de seu desenvolvimento: dos glóbulos polares, dos blastômeros e de células do blastocisto antes da implantação no útero, resultando na transferência de um embrião livre de anomalias cromossômicas e mutações genéticas, sendo uma importante ferramenta para auxiliar casais que enfrentam dificuldades para conceber um filho saudável.

O primeiro procedimento de PGD realizado com sucesso foi reportado em 1990, sendo utilizado para evitar o nascimento de crianças com doença ligada ao X e atualmente é realizado em diversas clínicas pelo mundo . Depois desse feito, houve uma popularização desse procedimento, sendo mais solicitado nos laboratórios e nas clínicas de reprodução humana assistida devido a sua alta eficácia para o sucesso da inseminação artificial.

Entre várias técnicas, destaca-se o PGT-A, a análise cromossômica do genoma do embrião. As **Aneuploidias** são alterações numéricas dos cromossomos, mas não de todos os pares. Um exemplo clássico de aneuploidia é a síndrome de Down, caracterizada pela trissomia do cromossomo 21.7. O PGT-A é responsável por diagnosticar a saúde cromossômica do embrião, proporcionando além de um sucesso maior na geração do feto, reduzindo taxas de abortamento e doenças cromossômicas relacionadas ao cariótipo dos pais. Caso o casal não tenha informações sobre esse dado, é recomendado uma cariotipagem, ou um mapeamento genético para constatar a probabilidade da alteração cromossômica na prole.

OBJETIVO: Comentar sobre a aplicabilidade e a relevância da técnica PGT-A na rotina laboratorial da reprodução humana assistida para o diagnóstico da saúde cromossômica do embrião.

MÉTODOS: Pesquisa bibliográfica a partir de dados secundários selecionados da base de dados: Scielo, lilacs e PubMed, publicados em Língua Portuguesa e Inglesa, em que o recorte temporal seguiu compreende o período de 2018 a 2023. Foram utilizados os seguintes descritores: **PGT-A, Aneuploidia, Fertilização in vitro, pgt-a aneuploidy, Preimplantation genetic testing for aneuploidy.**

DESENVOLVIMENTO: Sabe-se ainda que o PGD é a forma de diagnóstico com mais benefícios ao casal, principalmente por sua alta precisão nos resultados dos dados, e não invasiva. Todavia, questões como o alto custo do procedimento e a escassez de laboratórios que realizam esse exame são alguns aspectos negativos desse procedimento.

A realização do PGT-A se dá pela extração de uma célula do embrião por biópsia feita por micromanipulação, com microscópio equipado e ferramentas específicas para essa finalidade. O PGT-A depende da amplificação completa do genoma de pequenas quantidades do DNA de células removidas do trofoblasto e de um blastocisto para determinação de ganho ou perda de material cromossômico por NGS .

CONCLUSÃO: O PGT-A é uma importante técnica de complemento comum aos ciclos de FIV para o sucesso da gestação, indicado principalmente para casais cujo histórico familiar apresenta alguma presença de doenças derivadas de alterações no cariótipo.

REFERÊNCIAS:

POMPEU, T. N., & VERZELETTI, F. B. (2015). **Diagnóstico genético pré-implantacional e sua aplicação na reprodução humana assistida.** *Reprodução & Climatério*, <https://doi.org/10.1016/j.recli.2015.09.001>. Acesso em: 6 de set. 2023.

WILTON, L. (2022). **Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review.** *Prenatal Diagnosis*. <https://doi.org/10.1002/pd.388>. Acesso em: 6 de set. 2023.

PIZZATO, B. R., Pacheco, C. M. R., R. Ferreira, L. S., & Verzeletti, F. B. (2017). **Revisão das técnicas de biologia molecular aplicadas no diagnóstico genético pré-implantacional e uma reflexão ética.** *Reprodução & Climatério*. <https://doi.org/10.1016/j.recli.2016.10.001>. Acesso em: 6 de set. 2023.

CASPER, R. F. (2023). **PGT-A: Houston, we have a problem.** *Journal of assisted reproduction and genetics*. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-023-02913-w>. Acesso em: 6 de set.

2023.

GLEICHER, N. et al. (2023). **Previously reported and here added cases demonstrate euploid pregnancies followed by PGT-A as “mosaic” as well as “aneuploid” designated embryos.** *Reproductive biology and endocrinology:RB&E*, v. 21, n. 1, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9993652/>. Acesso em: 6 de set. 2023.

Relações evolutivas dos tripanossomas da subfamília Leishmaniinae do ponto de vista proteômico quantitativo utilizando a abordagem PhyloQuant

Simon Ngao Mule¹, Evaristo Villalba Alemán¹, Livia Rosa Fernandes¹, Joyce S. Saad¹, Gilberto Santos de Oliveira¹, Deivid Martins¹, Claudia Blanes Angeli¹, Deborah Brandt-Almeida¹, Mauro Cortez¹, Martin Røssel Larsen², Jeffrey J. Shaw¹, Marta M. G. Teixeira^{1*}, Giuseppe Palmisano^{1*}

¹ Departamento de Parasitologia - Instituto de Ciências Biomédicas II - Universidade de São Paulo, São Paulo – Brasil

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade do Sul da Dinamarca, Odense, DK, Dinamarca

O estudo da história das relações evolutivas, denominado filogenia, é crucial para a compreensão das semelhanças e diferenças entre os organismos, o que, no caso da interação patógeno- hospedeiro, é importante para elucidar características-chave adquiridas ou perdidas ao longo do tempo. A filogenia molecular, que envolve a análise comparativa de variações de sequências de nucleotídeos ou amino ácidos de genes e proteínas, respectivamente, tem sido a pedra angular no estudo da evolução molecular e da filogenética, e ajudar em separar organismos intimamente relacionados e a desvendar relações evolutivas anteriormente não descritas. Os avanços na proteômica baseada na espectrometria de massas permitiram a análise rápida, precisa e sensível de dados de alto rendimento e, nas últimas décadas, a aplicação da espectrometria de massas para a classificação e identificação de bactérias e outros microrganismos abriu o caminho para o desenvolvimento de novas metodologias para inferências evolutivas de organismos usando conjuntos de dados proteômicos. No presente trabalho, descrevemos um novo método, denominado PhyloQuant, para inferir relações evolutivas de organismos com base em intensidades diferenciais de expressão proteica após proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massa. Usando esta abordagem, reconstruímos as relações evolutivas entre os tripanossomas da subfamília Leishmaniinae, que compreende os agentes patógenos da leishmaniose. Congruente com a filogenética molecular a partir de sequências concatenadas de rRNA SSU e gGAPDH, mostramos que este método é capaz de agrupar espécies dixênicas do gênero *Leishmania*, subgêneros *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* e *L. (Mundinia)*, irmã de as espécies dixênicas dos gêneros *Endotrypanum* e *Porcisia*, enquanto espécies dos gêneros *Zelonia*, *Crithidia* e *Leptomonas*, até agora descritas como monoxênicas de insetos, embora eventualmente relatadas em humanos, foram posicionadas na base da assembleia dixênica. Este agrupamento foi mantido para intensidades normalizadas de proteínas e peptídeos dos softwares Proteome Discoverer (PD) e MaxQuant (MQ), ilustrando a robustez da abordagem PhyloQuant em diferentes plataformas de identificação e quantificação. Além disso, ao aproveitar o mapeamento de sinapomorfias, a abordagem Phyloquant permite a revelação de proteínas que suportam diferentes clados dentro da árvore filogenética, oferecendo assim mais informações cruciais para compreender as diferenças em muitos processos biológicos, interações hospedeiro-parasita-vetor, infecciosidade, patogenicidade, virulência, adaptação a novos hospedeiros e vetores e manifestações de doenças dos organismos em estudo.

Palavras-chave: PhyloQuant; Espectrometria de massa; Leishmaniinae; Evolução.

Agradecimentos: Este estudo foi financiado por auxílios e bolsas da FAPESP (2018/18257-1, 2018/15549-1, 2020/04923-0 para G.P.; 2017/04032-5 e 2021/14751-4 para S.N.M.; 2016/23689 -2 para J.S.S.; 2018/13283-4 para G.S.D.O., 2021/14179-9 para D.M., e 2020/13562-0 para M.C.), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) (“bolsa de produtividade” para G.P.). Gostaríamos também de reconhecer e agradecer a Omar A. Espinosa pelos primeiros estudos sobre *Zelonia* spp. do Panamá, e Marta Campaner pelo apoio na cultura dos parasitas utilizados neste estudo. Por fim, gostaríamos de agradecer ao falecido Prof. Erney Plessman Camargo pelas discussões construtivas e esclarecedoras durante este estudo

DESIGN OF A MULTI-EPITOPE CHIMERIC VACCINE TARGETING SURFACE PROTEINS OF *Leishmania infantum*

Xavier, D.S. e Alves, J.M.P., Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences - USP

Introduction and objectives: Considering the relevance of surface proteins in parasitic development and direct interaction with the host organism, certain approaches are intended to utilize these components as potentiating vaccines for diseases of global importance. Some *in silico* screening strategies can facilitate the selection of these targets and circumvent the challenge of antigenic complexity, selecting targets that will be more easily recognized by the immune system (such as externalized proteins, for example) and construction of multi-epitope compounds. Leishmaniasis is a neglected pathology responsible for nearly two thousand new cases and between 20 and 30 thousand deaths annually. The visceral manifestation is characterized as a more severe form of the disease and is caused mainly by *L. infantum*, which still does not have a well-established therapeutic or vaginal model. That said, this project presents a reverse vaccinology pipeline for initial screening of protein targets with vaccine potential and subsequent submission of the proteins found to epitope prediction for the construction of a multi-epitope chimeric protein. **Methods:** For this, the proteome of *Leishmania infantum* (UP000008153) was selected from the UniProt database, and submitted to a succession of tools aimed at selecting (i) surface or extracellular proteins (predicted by DeepLoc), (ii) wide distribution of orthologs (performed by OrthoFinder), which shows (iii) low similarity with the host (performed by BLASTp), and which have (iv) negative prediction for allergenicity (performed by AlgPred 2.0) and (v) positive for antigenicity (performed by VaxiJen). **Results and conclusions:** Seven proteins were identified and some of them have already been experimentally associated with essential functions in the survival of the parasite and in establishing the relationship with the host cells, according to the literature. Others are hypothetical proteins that may have novel vaccine applicability. The construction of the chimera was carried out initially by submitting the proteins found for signal peptide cleavage (performed by SignalP 6.0) and subsequent prediction of lymphocyte epitopes TCD4+ (performed by netMHCII 2.3), TCD8+ (performed by netCTL 1.2) and B (performed by BepiPred 2.0). The ideal chimeric configuration is still being standardized, exploring some physicochemical parameters of different linkers, adjuvants and epitope arrangement. **Financial support:** This project is financed by FAPESP (2022/01262-8).

CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA CODIFICADA PELO GENE PBANKA_1459100 COMO UM RECEPTOR DE ATIVAÇÃO DA GAMETOGÊNESE EM *Plasmodium*.

Novais, J.T., Marques, R.F., Gaitán, X.A., Gimenez, A.M., Bargieri, D.Y.

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo

Introdução e Objetivos: A malária é uma doença tropical infecciosa causada por um parasito do gênero *Plasmodium*. Apesar de ser uma doença possível de ser prevenida e tratada, ainda é considerada mortal. Apenas em 2022, ocasionou cerca de 249 milhões de casos e 608 mil mortes ao redor do globo. Atualmente, os gametócitos, formas do parasito presentes na corrente sanguínea de indivíduos infectados, vêm se tornando alvo de estudos, uma vez que essa é a forma infectante para o mosquito vetor e, portanto, responsável pela transmissão da doença.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa identificou que o gene de *Plasmodium berghei* PBANKA_1459100 é essencial para a fertilização, dado que a depleção do gene é capaz de inibir a ativação dos gametócitos e a continuação do ciclo sexuado do parasito. Logo, os objetivos desse trabalho são a caracterização funcional da proteína codificada pelo gene PBANKA_1459100, de forma a entender sua importância na gametogênese do parasito.

Métodos e Resultados: Para avaliar se a proteína em questão pode ser responsável pela entrada de compostos na células por *Thiol Mediated Uptake* (TMU), 2 oligonucleotídeos foram adquiridos, um convencional (ODN) e o outro tiolado (S-ODN), ambos marcados com o fluoróforo Cy3. A presença desses compostos dentro de gametócitos de *P. berghei* WT e *knockout* para a proteína PBANKA_1459100 (1459100KO) foram avaliadas por microscopia de fluorescência, que mostrou que apenas o S-ODN é capaz de ser internalizado por gametócitos de *P. berghei* WT. Porém, o mesmo resultado foi observado para o parasito mutante.

Para avaliar se a proteína em questão é importante na sinalização de cálcio intracelular, realizamos um teste de exflagelação com o parasito 1459100KO na presença de ionóforo de cálcio. O aparecimento de centros de exflagelação foi observada por microscopia. Para esse ensaio, não foram observados qualquer centro de exflagelação. Em paralelo, para que seja possível a localização da proteína, parasitos mutantes com a inserção de duas *tags* no final da proteína de estudo, HA e GFP, estão sendo produzidos.

Conclusão: Gametócitos de *Plasmodium berghei* são capazes de internalizar compostos tiolados por TMU, evento esse nunca descrito para o gênero até o momento. Porém, tal processo não parece possuir relação com a proteína em estudo. Ainda assim, esses resultados serão explorados. A proteína Pb1459100 também não parece possuir relação com a sinalização de cálcio intracelular. A marcação da proteína em questão com as *tags* propostas podem ajudar a elucidar sua função no parasito.

Suporte financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo – FAPESP.

ABCG1 TRANSPORTER AS A VIRULENCE FACTOR IN *Leishmania amazonensis*

Barbosa, G. R.¹, Soares, G. H. C.¹, Cavalcante T.¹, Coelho, A. C.², Stolf, B. S. ¹

1. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP;
2. Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.

Abstract

Introduction and Objectives

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by protozoan parasites from the genus *Leishmania*. The clinical outcomes vary from several manifestations of tegumentary leishmaniasis (LT) to visceral leishmaniasis (LV), according to parasite species, isolate, and host immunological background. *Leishmania* is an heteroxenous parasite: the flagellated and motile promastigotes are present in the invertebrate host while the intracellular amastigotes develop in the parasitophorous vacuole of phagocytic cells from vertebrate hosts. To survive in different microenvironments, *Leishmania* relies on virulence factors, molecules secreted or present on its surface that ensure the establishment of infection. Our group has been exploring virulence factors of LV79 and PH8 strains of *Leishmania amazonensis*, which exhibit different virulence profiles. Recently, the proteomic analysis of membrane fractions revealed that ABCG1 transporter is 23-fold more abundant in the virulent PH8 strain. ABCG1 is a member of the ABC transporter family, a group of proteins often associated to drug resistance and virulence in *Leishmania*. However, the role of ABCG1 in *L. amazonensis* virulence had never been explored. The aim of this work is to assess the impact of ABCG1 in *L. amazonensis* virulence and in vector colonization.

Methods and Results

L. (L.) amazonensis lacking ABCG1 transporter was generated using the CRISPR-Cas9 method. Our results showed that the lack of the ABCG1 does not affect the parasite growth curve, the susceptibility of promastigotes to trivalent antimony and the resistance to complement lysis. However, the Δ ABCG1 parasites showed decreased infectivity *in vitro*, and the add-back parasites recovered the wild-type infectivity phenotype. Over a period of 10-weeks, animals infected with Δ ABCG1 parasites exhibited smaller footpad lesions compared to those infected with the wild-type and add-back lines.

Conclusion

The loss of ABCG1 decreased virulence and infectivity of the parasites. The next step of this work is to characterize the LPG profiles and sand fly colonization capacity of the mutants.

Financial Support: FAPESP, CAPES.

Keywords:

Leishmania (L.) amazonensis; virulence factors; ABCG1 transporter; CRISPR-Cas9

COMPLEXO DE PRÉ-REPLICAÇÃO EM *Trypanosoma cruzi*: PAPEL DA FOSFORILAÇÃO DA PROTEÍNA ORC1CDC6 E BUSCA POR SEUS INTERATORES

de Oliveira, M.M, Elias, M.C.

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Laboratório de Ciclo Celular, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

Introdução e Objetivos: o complexo de pré-replicação (CPR) é um complexo proteico formado nas origens de replicação na transição G1/S do ciclo celular, com o objetivo de estabelecer a forquilha de replicação para iniciar o processo de duplicação do DNA. O CPR é formado, na maioria dos eucariotos, por um hexâmero ORC – *Origin Recognition Complex* –, proteínas Cdc6, Cdt1 e MCM, outro complexo proteico essencial para a abertura da dupla fita de DNA futuramente no processo. Embora ORC se mostre conservado entre os eucariotos, nem todas as subunidades são essenciais para o funcionamento do CPR. Entre os tripanossomatídeos, há um homólogo de ORC1 e Cdc6, nomeado Orc1Cdc6, compondo o CPR. Para o *Trypanosoma brucei*, um ortólogo altamente divergente de Orc4, as subunidades 2 e 5 do complexo, e uma proteína Orc1-like (nomeada Orc1b) já foram descritos. Para o *Trypanosoma cruzi*, as demais subunidades, se existem, ainda não foram descritas. Diante disso, o projeto visa buscar por interatores de Orc1Cdc6, utilizando uma linhagem tagueada de *T. cruzi*. **Métodos e Resultados:** utilizando CRISPR/Cas9, uma linhagem Orc1Cdc6-tag, contendo *tags myc* e TurboID foi gerada. Dessa forma, tanto a busca por modificações pós-traducionais em Orc1Cdc6 quanto a busca por interatores estáveis – como as demais subunidades do complexo – e dinâmicos pode ser realizada através de espectrometria de massas. A linhagem Orc1Cdc6-tag foi construída e validada através de PCR, *Western Blot* e sequenciamento, sendo possível confirmar a inserção dos *tags* e seu correto *frame* de leitura com Orc1Cdc6. Comparada a linhagem controle (Cas9) Orc1Cdc6-tag apresenta maior crescimento e não apresentou alterações significativas em seu ciclo celular, sendo possível sincronizar essa linhagem com hidroxiuréia. A inserção do *tag* não interferiu na interação de Orc1Cdc6 com o DNA e não alterou a localização da proteína, presente no espaço nuclear do parasito durante todo o ciclo celular. **Conclusão:** O uso da metodologia CRISPR/Cas9 possibilitou a construção de uma linhagem tagueada que será utilizada para a) realizar a sincronização celular e extração proteica, seguida de

imunoprecipitação para avaliar a fosforilação de Orc1Cdc6 em diferentes pontos do ciclo;

b) imunoprecipitar Orc1Cdc6-tag e buscar por seus interatores através de espectrometria de massas, pela técnica de *proximity labeling* com o TurboID. Com isso buscamos compreender o papel da fosforilação na modulação de Orc1Cdc6, essencial para a replicação do *T. cruzi*, e contribuir com o esclarecimento dos componentes do CPR nesse organismo. Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPESP (Processos 23/00557-7 e 20/00694-6).

Previous exposure with Chikungunya or Mayaro prevents footpad inflammation induced by heterologous infection.

RAQUEL DE OLIVEIRA SOUZA 1, VICTORIA SIMÕES DELLA CASA 1, JOSÉ WANDILSON BARBOZA DUARTE JÚNIOR 1, CARLA CLASER 2.

1 *Universidade de São Paulo - USP, INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS- Departamento de Parasitologia-SP, Brasil. E-mail: rakell.bio21@gmail.com , carlaclaser@gmail.com*

2 *Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, Departamento de Microbiologia , Imunologia e Parasitologia (DMIP)*

Introduction and aim: Ecological changes have contributed to an upsurge in epidemic outbreaks of arboviruses in Brazil, including Chikungunya (CHIKV) and Mayaro (MAYV) viruses. Recent studies have demonstrated that prior exposure to an alphavirus elicits a humoral response in exposed individuals, offering protection against reinfection and partial cross-protection against heterologous infection. Therefore, our aim was to establish models of co-infection with CHIKV and MAYV in adult C57BL/6 mice to investigate how the co-infections modulate the progression of infection for both viruses. This project aims to study how the humoral and cellular immune response, with a focus on B cells, is modulated by MAYV and CHIKV in co-infected mice, using different co-infection models. **Methodology and Results :** Mice were infected with 5×10^6 PFU of both viruses on the right footpad, under the following conditions: **1.** Concurrent coinfection; **2.** pre MAYV and 7 days later CHIKV; **3.** pre CHIKV and 7 days later MAYV; **4.** pre CHIKV and 14 days later MAYV; **5.** pre MAYV and 14 days later CHIKV. Blood viraemia, joint inflammation, footpad viral load, histology, and popliteal lymph nodes immunophenotyping were conducted. Our data demonstrated that concurrent co-infection didn't alter footpad inflammation and tissue damage, blood viraemia, footpad viral load, and cellular infiltration in the lymph node. Interestingly, previous exposure 7 or 14 days with MAYV, prevented CHIKV viraemia, footpad viral load and peak of inflammation, reduced cellular infiltration in the lymph node even though footpad damage was observed. Similar findings were observed when mice were previously exposed to CHIKV, either 7 or 14 days. Mice were infected with 5×10^6 PFU of both viruses on the right footpad, under the following conditions: **1.** Concurrent coinfection; **2.** pre MAYV and 7 days later CHIKV; **3.** pre CHIKV and 7 days later MAYV; **4.** pre CHIKV and 14 days later MAYV; **5.** pre MAYV and 14 days later CHIKV. Blood viraemia, joint inflammation, footpad viral load, histology, and popliteal lymph nodes immunophenotyping were conducted. **ys.** In conclusion, our data suggests that previous exposure with an alphavirus prevents the peak of inflammation induced by heterologous infection and reduces the cellular infiltration in the lymph nodes.

Financial Support: FAPESP 2022/15124-6, 2018/24470-0

DETERMINAÇÃO DO PAPEL DA MICROBIOTA NO FITNESS E NA COMPETÊNCIA VETORIAL DO CARRAPATO *AMBLIOMMA AUREOLATUM*. Antão, S.C., Fogaça, A.C., Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas II-USP

Introdução e Objetivos: A febre maculosa brasileira (FMB) é uma doença infecciosa grave causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* e transmitida pela picada de carrapatos infectados. No Brasil, *R. rickettsii* é transmitida por duas espécies de carrapatos: *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma aureolatum*. Apesar de ambas as espécies serem importantes na transmissão da bactéria, *A. sculptum* possui uma menor susceptibilidade à infecção que *A. aureolatum*. Estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que as diferenças de susceptibilidade entre as duas espécies à infecção por *R. rickettsii* se correlacionam com respostas transcricionais distintas no intestino. Em *A. sculptum*, a maioria dos genes modulados pela infecção é induzida, incluindo componentes do sistema imune, enquanto em *A. aureolatum*, os genes modulados são majoritariamente reprimidos. Também observamos que o número total de bactérias da microbiota intestinal difere entre as duas espécies: enquanto *A. sculptum* possui uma microbiota reduzida, *A. aureolatum* possui uma microbiota proeminente e majoritariamente composta por bactérias do gênero *Francisella*. Esses resultados sugerem que *Francisella* dessensibilize o sistema imune no intestino de *A. aureolatum*, criando um ambiente favorável para a colonização de *R. rickettsii*. Com base nos resultados obtidos anteriormente, esse projeto possui como principal objetivo determinar a relação da microbiota com o *fitness* e a competência vetorial de *A. aureolatum* à *R. rickettsii*.

Métodos e Resultados: Fêmeas adultas de *A. aureolatum* ingurgitadas foram injetadas com antibióticos (tetraciclina, ciprofloxacina ou rifampicina). Como controle, os carrapatos não foram tratados com antibióticos. Enquanto o tratamento com tetraciclina ocasionou uma diminuição da carga bacteriana nos ovos, nenhum efeito foi observado pelo tratamento com ciprofloxacina ou rifampicina. As larvas que eclodiram dos ovos do grupo controle e do grupo tratado com tetraciclina foram alimentadas sobre cobaias infectadas ou não com *R. rickettsii*. Não foram observadas diferenças significativas na aquisição de *R. rickettsii* entre tratados grupos. No entanto, as larvas tratadas com tetraciclina sofreram uma diminuição significativa na porcentagem de muda da fase de larva para a fase de ninfa tanto no grupo não exposto (0,4% tratado e 22,5% controle) quanto no grupo exposto à infecção por *R. rickettsii* (24,5% tratado e 61% controle).

Conclusão: Em conjunto, os resultados indicam que a alteração da microbiota causa um prejuízo para o *fitness* de desenvolvimento de *A. aureolatum*, embora aparentemente não interfira em sua competência vetorial. Os experimentos estão sendo repetidos para a confirmação dos resultados obtidos. Espera-se que ao final deste projeto, seja possível compreender a importância da microbiota para o *fitness* e a competência vetorial de *A. aureolatum* à *R. rickettsii*.

Apoio Financeiro: FAPESP (Processo 2022/09055-1), CAPES e CNPq.

AÇÃO DE BLOQUEADORES DO GLICOSSOMO SOBRE INFECÇÕES POR *LEISHMANIA AMAZONENSIS* E *LEISHMANIA INFANTUM*

Sousa, J.M.¹, Zanatta, J.M.², Muxel, S.M.², Stolf, B.S.¹

1. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP;

2. Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

Introdução e objetivos: As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas endêmicas em mais de 90 países, entre eles o Brasil. As opções de tratamento disponíveis são insatisfatórias, seja pela toxicidade e eficiência variável, seja pelo aparecimento de recidivas. Os glicossomos, organelas de protozoários Trypanosomatidae, abrigam enzimas essenciais da via glicolítica e de outras vias metabólicas, as quais são produzidas no citoplasma e transportadas por proteínas PEX. A interação PEX5-PEX14 é crucial para esse transporte. Em trabalhos recentes, um farmacóforo 3D sintético mimetizando essa ligação bloqueou a interação PEX5-PEX14, sendo tóxico para *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*, com baixa toxicidade para células de mamíferos. Dada a importância do glicossomo para viabilidade de tripanossomatídeos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida de 4 compostos pré-selecionados em formas promastigotas e em modelos *in vitro* de infecção com *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, bem como a citotoxicidade destas moléculas em células de mamíferos.

Métodos e Resultados: Os compostos pré selecionados foram DOL630, TF243, TF254 e TF257. A avaliação de atividade contra formas promastigotas de *Leishmania* spp. foi feita por citometria de fluxo após 72h de incubação. Todos os compostos levaram a redução na viabilidade dos parasitos, com os valores de EC50 variando de $5.2 \pm 2.1 \mu\text{M}$ a $60.1 \pm 14.5 \mu\text{M}$ para *L. infantum* e de $5.6 \pm 0.7 \mu\text{M}$ a $15.4 \pm 1.7 \mu\text{M}$ para *L. amazonensis*. A toxicidade em macrófagos murinos (células RAW 264.7) e humanos (células THP1) foi mensurada por ensaio colorimétrico alamarBlue e mostrou-se relativamente baixa, com valores de CC50 entre 8.4 e 51.8 μM . Ensaio de infecção de células RAW 264.7 pelas duas espécies de parasitos seguida de incubação por 72h com os compostos indicaram que as quatro moléculas exibiram atividade leishmanicida contra amastigotas intracelulares, com valores de EC50 entre 1.4 ± 0.1 e $3.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$. Os índices de seletividade dos compostos variaram de 4.3 a 22.3, indicando boas perspectivas de atividade antiparasitária sem danos significativos ao hospedeiro. Análises de ADME *in silico* mostraram bons parâmetros, favorecendo ensaios *in vivo*. Dois dos compostos serão testados *in vivo* em camundongos BALB/c.

Conclusão: Os 4 compostos escolhidos exibiram atividade contra formas promastigotas de duas espécies de *Leishmania* de grande relevância epidemiológica no Brasil. Além disso demonstraram capacidade de atravessar o vacúolo parasitóforo e exercer atividade leishmanicida *in vitro* com índices de seletividade bastante promissores.

THE ROLE OF IL-1 β IN THE POOR BIRTH OUTCOMES ASSOCIATED TO MALARIA IN PREGNANCY

Carvalho Junior, A.R.¹, Daineze, B.P.¹, Barboza, B.R.¹, Separovic, E.P.M.¹, Epiphanio, S.², Palmisano, G.¹, Marinho, C.R.F.¹

¹Department of Parasitology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo – USP.

²Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo – USP.

Introduction and aims. Malaria is the main parasitic human disease. In 2022, 12 million pregnant women were exposed to *Plasmodium falciparum*, resulting in about 914 thousand children with low birth weight in Africa. Evidence suggests that the maintenance and progression of inflammatory response against *P. falciparum* infection are characterised by cytokines such as IL-1 β in the placenta environment, which have been associated with reduced birthweight. Given that the mechanism by which IL-1 β cytokines could lead to poor birth outcomes remain poorly understood, this work aims to evaluate its effect on the modulation of nutrient transporters expression in the placenta. **Material and results.** The study used an experimental model in C57BL/6Ntac wild-type dams infected with *P. berghei* NK65GFP. Successful pregnancy confirmed at gestational day 12.5 (Gd12.5) were submitted to experimental intravenous injection or used as non-infected controls. C-sections were performed at Gd14.5, Gd16.5, Gd17.5 and Gd18.5 to evaluate the expression of IL-1 β , glucose and amino acids transporters expression alongside with pregnancy outcomes. Levels of IL-1 β were assessed by ELISA in placental extracts and plasma and mRNA expression assessed by qPCR. The results showed a reduction in fetal weight in infected dams, which became more pronounced at Gd18.5 six days post-infection (dpi). The fetal/placental weight ratio, a proxy for placental efficiency, also decreased. The expression of IL-1 β in response to the infection was upregulated at early timepoints (Gd14.5 and Gd16.5) and downregulated at Gd18.5, contrasting with the glucose transporter isoform 1 (GLUT1) which showed the opposite pattern. **Conclusion.** The study demonstrates a duality in the placental environment, which attempts to combat the infection while maintaining fetal development. The results suggest that early upregulation of IL-1 β in response to infection causes a downregulation of glucose transporter in the placenta, potentially impacting fetal weight.

Support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2019/12078-0).

COMPARATIVE ANALYSIS OF GESTATIONAL OUTCOMES IN DIFFERENT SUBSTRAINS OF C57BL/6 MICE INFECTED WITH *P. berghei* NK65.

Daineze, B.P.¹, Carvalho Junior, A.R.¹, Separovic, E.P.M.¹, Marinho, C.R.F.¹

¹Laboratory of Experimental Immunopathology, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo – USP.

Introduction and aims. Malaria is a public health problem in most tropical countries, and pregnant women are one of the risk groups for the disease. Over the years, the C57BL/6 mice strain has become the most used animal in experiments. Some studies have also shown their importance in understanding malaria pathogenesis in pregnant women. However, new substrains have developed with different genetic and phenotypic characteristics because of their everyday use in experiments. Therefore, these differences and their impacts must be better explored and, in many cases, ignored. For this reason, we aim to evaluate the impact of genetic differences between two of the most used C57BL/6 substrains – C57BL/6NTac and C57BL/6J – on the development of poor outcomes associated with malaria during pregnancy. To carry out a comparative analysis, we intend to: (I) evaluate the impact of malaria on fetal development in C57BL/6J and C57BL/6NTac mice infected with *P. berghei* NK65 during pregnancy; (II) study the immune response due to *P. berghei* NK65 infection during pregnancy in C57BL/6NTac and C57BL/6J, and its association with poor gestational outcomes related to malaria in pregnancy. **Methods and results.** By using an experimental murine model of malaria in pregnancy, we obtained pregnant mice from both substrains, which were submitted, or not, to *P. berghei* infection (iv, with 8×10^5 red blood cells parasitised by *P. berghei* NK65 GFP). Then, they were analysed according to their: (i) Peripheral parasitemia levels by flow cytometry, (ii) Placental parasitemia levels by qPCR, (iii) Histological analysis with H&E staining, (iv) Fetal development by viability and weight and (v) Inflammatory immune response by CBA. Thus, since pregnancy is a risk factor for the development of severe malaria cases, it was possible to note in infected pregnant females, from both substrains, a considerable increase in spleen weight along with an anemic condition compared to uninfected pregnant animals. About the fetuses, the analysis shows a reduced weight and viability of those from infected females; a reduction is observed in the ratio of infected animals between the fetus's weight and their placenta weight – analysis commonly used as a proxy for placental efficiency. **Conclusion.** So far, we conclude that the murine model used in the experiments mimics various characteristics of malaria complications and the poor gestational outcomes observed in human disease. Even though the model was helpful in both substrains, it is noticeable that the primary outcomes of the disease in humans were more representative in C57BL/6NTac animals.

Support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2023/05105-7).

Otimização de um método para o estudo das interações proteína-RNA.

Caroline Wanjiru Gachuhi¹, Simon Ngao Mule¹, Priscila Robertina dos Santos Donado¹, Deivid Martins Santos¹, Claudia Blanes Angeli¹, Livia Rosa Fernandes¹, Walter Colli², Suely Kazue Nagahashi Marie³, Maria Julia Manso Alves², Giuseppe Palmisano¹

¹Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo

³Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

As interações entre proteínas e RNA são cruciais para o bom funcionamento e regulação de diversos processos celulares, influenciando significativamente o processamento das moléculas de RNA. Essas interações ocorrem em vários estágios, como transcrição, splicing, transporte, localização e degradação, garantindo que o RNA seja efetivamente processado e utilizado dentro da célula. As proteínas de ligação ao RNA (RBPs) são componentes-chave nessas interações, e obter insights sobre elas pode melhorar nossa compreensão da expressão e regulação gênica na fisiologia celular. O impacto das interações proteína-RNA estende-se além de uma doença específica ou ambiente celular, uma vez que desempenham um papel essencial em muitos estados patológicos, incluindo infecções virais, onde os vírus muitas vezes exploram os RBPs do hospedeiro para facilitar a sua própria replicação. Isto demonstra a flexibilidade e adaptabilidade dos mecanismos de ligação ao RNA na saúde e em doenças. Estudos prévios têm demonstrado os avanços nas pesquisas entre RNA e proteínas com potencial desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras, podendo alterar eficientemente o tratamento de inúmeras doenças. Devido à necessidade contínua de investigação nesta área da biologia molecular, nosso estudo se valerá da otimização da técnica de Separação Ortogonal de Fases Orgânicas (OOPS), no qual as interações RNA-proteína serão realizadas com amostra reduzida e a exigência para tipos específicos de RNA. A OOPS é realizada pela amostragem da interface da extração de TRIzol padrão, para enriquecer proteínas de ligação ao RNA (RBPs) juntamente ao RNA associado. O diferencial OOPS é sua capacidade de recuperar proteínas de ligação ao RNA, que interagem com RNAs codificantes e não codificantes, em contraste com métodos que dependem exclusivamente da seleção poli-A. Esta técnica é eficaz no isolamento de RBPs de diversos tipos de células, como células embrionárias, células tumorais, linhagens de células humanas não-tumorais e bactérias. Assim, a OOPS é uma ferramenta robusta para explorar as interações RNA-proteína em inúmeros processos biológicos e condições dinâmicas. Nós investigamos as interações RNA-proteína em células humanas infectadas com *T. cruzi* em vários momentos, para entender como essas interações evoluem à medida que a doença progride. O

protocolo é baseado na irradiação UV de células para criar adutos de proteína-RNA, seguido de lise celular e múltiplas rodadas de separação de fases para enriquecer esses adutos. A especificidade da OOPS é aumentada em seus estágios finais, onde interfaces enriquecidas são digeridas com RNases ou proteases, para liberar os RBPs ou o RNA ligado às proteínas. Este método nos permitirá recuperar RNA e proteínas livres (não reticulados), bem como adutos de RNA-proteína reticulados por UV de uma única amostra.

Palavras-chave

Proteínas de ligação a RNA (RBPs), reticulação UV, OOPS.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processos nº 2018/18257-1 (GP), 2018/15549-1 (GP), 2020/04923-0 (GP), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CMG, GP).

MALARIA IN PREGNANCY: ASSOCIATED MATERNAL MARKERS WITH NEONATAL OUTCOME

Santos, M.I. dos¹; Carvalho Júnior, A.¹; Gomes L.C.¹; Separovic, E.P.M¹; Sabrina Epiphanyo²; Jamille Dombrowski¹; Cláudio Marinho¹

¹Department of Parasitology, Biomedical Science Institute, University of São Paulo (ICB/USP), São Paulo, Brazil

²Department of Clinical and Toxicologic Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

E-mail: ines.santos@icb.usp.br

Introduction: Malaria represents a burden worldwide, responsible for several adverse outcomes, especially in susceptible populations such as pregnant women. One of the main consequences of malaria in pregnancy is fetal growth restriction, characterized by babies born small for gestational age due to intrinsic or extrinsic causes. This issue is associated with complications such as metabolic diseases and neurological outcomes. Despite existing screening exams, they lack accuracy, and the confirmation occurs at delivery. **Objective:** To identify maternal plasma proteins associated with newborn underweight in the context of malaria in pregnancy. **Methods:** 600 pregnant women were enrolled and followed until delivery in a cohort study in the Brazilian Amazon between 2013 and 2015. After exclusion, 159 *P. vivax*-infected, 74 *P. falciparum*-infected, 72 mixed-infected, and 170 non-infected pregnant women were selected. Newborn outcomes were registered. ELISA measured Leptin, Tie2, Ang2, PlGF, and sFlt1 in maternal peripheral plasma at delivery. Differences were analyzed using Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test. Multivariate logistic regression was used to determine the association between underweight and protein levels. **Results:** According to infection status, women with *P. falciparum* ($p = 0.001$) and mixed infection ($p < 0.001$) had lower leptin levels; women infected by *P. falciparum* showed a decrease in sFlt1 ($p = 0.03$) and sFlt1/PlGF ratio ($p = 0.01$) when compared to the non-infected group. All groups of infection had higher levels of Tie-2 ($p < 0.001$) when compared to the non-infected group. Of the five proteins, an increase in sFlt-1 was associated with the outcome of small for gestational age among infected women ($p = 0.01$). **Conclusion:** sFlt-1 might represent a potential biomarker for newborns underweight during malaria in pregnancy. However, considering the differences between the species of infection and the gestational period, this potential must be evaluated. Further analysis should be carried out with other potential proteins that could improve diagnostic methods, intervention, and treatment for fetal growth restriction.

Financial support: FAPESP, CAPES, and CNPq

MALARIA IN PREGNANCY: ASSOCIATED MATERNAL MARKERS WITH NEONATAL OUTCOME

Santos, M.I. dos¹; Carvalho Júnior, A.¹; Gomes L.C.¹; Separovic, E.P.M¹; Epiphanyo, S.²; Dombrowski, J.G.¹; Marinho, C.R.F.¹

¹Department of Parasitology, Biomedical Science Institute, University of São Paulo (ICB/USP), São Paulo, Brazil

²Department of Clinical and Toxicologic Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

E-mail: ines.santos@icb.usp.br

Introduction: Malaria represents a burden worldwide, responsible for several adverse outcomes, especially in susceptible populations such as pregnant women. One of the main consequences of malaria in pregnancy is fetal growth restriction, characterized by babies born small for gestational age due to intrinsic or extrinsic causes. This issue is associated with complications such as metabolic diseases and neurological outcomes. Despite existing screening exams, they lack accuracy, and the confirmation occurs at delivery. **Objective:** To identify maternal plasma proteins associated with newborn underweight in the context of malaria in pregnancy. **Methods:** 600 pregnant women were enrolled and followed until delivery in a cohort study in the Brazilian Amazon between 2013 and 2015. After exclusion, 159 *P. vivax*-infected, 74 *P. falciparum*-infected, 72 mixed-infected, and 170 non-infected pregnant women were selected. Newborn outcomes were registered. ELISA measured Leptin, Tie2, Ang2, PlGF, and sFlt1 in maternal peripheral plasma at delivery. Differences were analyzed using Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test. Multivariate logistic regression was used to determine the association between underweight and protein levels. **Results:** According to infection status, women with *P. falciparum* ($p = 0.001$) and mixed infection ($p < 0.001$) had lower leptin levels; women infected by *P. falciparum* showed a decrease in sFlt1 ($p = 0.03$) and sFlt1/PlGF ratio ($p = 0.01$) when compared to the non-infected group. All groups of infection had higher levels of Tie-2 ($p < 0.001$) when compared to the non-infected group. Of the five proteins, an increase in sFlt-1 was associated with the outcome of small for gestational age among infected women ($p = 0.01$). **Conclusion:** sFlt-1 might represent a potential biomarker for newborns underweight during malaria in pregnancy. However, considering the differences between the species of infection and the gestational period, this potential must be evaluated. Further analysis should be carried out with other potential proteins that could improve diagnostic methods, intervention, and treatment for fetal growth restriction.

Financial support: FAPESP, CAPES, and CNPq

IN VITRO AND IN VIVO PHENOTYPES OF *LEISHMANIA AMAZONENSIS* ISOLATES FROM LOCALIZED AND DIFFUSE CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Soares, G.H.C.¹, Barbosa, G.R.¹, Ferreira, A.L.², de Azevedo, C.M.P.S.³, Costa, J.M.L.⁴, Lindoso, J.A.L.⁵, Lima, M.I.S.², Stolf, B.S.¹

1. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP;
2. Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA;
3. Departamento de Medicina I, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA;
4. Instituto Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador – BA;
5. Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

Abstract

Introduction and Objectives

Leishmania amazonensis is a widely distributed parasite in the Brazilian Amazon. In humans, symptomatic infections by this species usually result in localized cutaneous leishmaniasis (LCL), but sometimes cause diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL), which are clinical syndromes with polar features. The parasite factors that influence these clinical outcomes remain largely unknown. Analyzing clinical isolates from LCL and DCL patients can provide valuable insights into these molecules. The objective of this study was to characterize the virulence traits of clinical isolates and select those with distinct profiles for further identification of potential genetic determinants underlying these differences in virulence.

Methods and Results

We investigated the infectivity of a panel of *L. amazonensis* isolates from LCL and DCL patients in bone marrow-derived macrophages. The *in vitro* infectivity of promastigotes was heterogeneous, ranging from 28 to 69%. We selected four clinical isolates (the most- and least infective isolates of each clinical syndrome) and confirmed their infectivity profiles using axenic amastigotes. We further assessed the macrophage response to infection of each these isolates by measuring nitric oxide production and arginase activity. Finally, we evaluated the virulence of these isolates in BALB/c mice. Our results showed that clinical isolates from LCL patients retained their infectivity profile in *in vivo* model, whereas isolates from DCL patients exhibited a change in their profile.

Conclusion

Taken together, our findings highlight the heterogeneity in the infectivity of *L. amazonensis* isolates and suggest that parasite-intrinsic factors influence virulence and possibly contribute to the clinical syndrome.

Financial Support: FAPESP; CAPES.

Keywords: clinical syndromes, DCL, LCL *Leishmania amazonensis*, virulence.

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ESPECTROMETRIA DE MASSA BASEADO EM ÍONS OXÔNIO PARA MEDIR A GLICOSILAÇÃO DE GLICOPROTEÍNAS

Angeli, C.B., Lázari, L.C., de-Toledo, T.M., Marques-Neto, A.M.M., Rosa-Fernandes, L., Palmisano, G., Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução: A glicosilação de proteínas é uma modificação pós-traducional caracterizada pela ligação covalente de mono, oligo e polissacarídeos ou glicanos aos resíduos de aminoácidos asparagina (glicosilação N-ligada) ou serina/treonina (glicosilação O-ligada), desempenhando um papel crucial em sua estabilidade e função e, conseqüentemente, no controle de processos biológicos. Anticorpos terapêuticos e biossimilares têm glicanos ligados às suas cadeias leves e/ou pesadas, tendo importante papel em sua farmacocinética, eficácia e segurança. Vários métodos de LC-MS/MS, bem como ferramentas computacionais tem sido desenvolvidos para avaliar o padrão de glicosilação dessas moléculas. O objetivo desse trabalho foi desenvolver um método rápido, sensível e preciso para monitorar as características da glicosilação de glicoproteínas, podendo ser usado no controle de qualidade de anticorpos terapêuticos e outras glicoproteínas.

Materiais e métodos: Três glicoproteínas padrão foram utilizadas para padronização do método: RNaseB, Fetuína e IgG humana. As análises de LC-MS/MS foram realizadas em um EasyII nLC acoplado ao espectrômetro de massa LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific). Os métodos testados têm 35 min de duração, com gradiente de 10 min, consistindo em várias janelas de MS1 full scan, seguidas imediatamente pelo MS2 de todos os íons do scan MS1 anterior, usando fragmentação em HCD com 35% de energia de colisão e resolução de 7500. Paralelamente foi desenvolvido um algoritmo computacional para extrair os íons oxônio, quantificá-los e comparar sua intensidade entre as diferentes corridas de LC-MS/MS. Para testar a acurácia do método, as glicoproteínas padrão foram tratadas com PNGase F, para remoção dos glicanos N-ligados e então a intensidade dos íons oxônio específicos dos glicanos foi comparada entre as amostras.

Resultados: Inicialmente foram comparados quatro métodos de LC-MS/MS, nos quais as faixas de m/z em MS1 e MS2, bem como o número de janelas MS1, foram modificados para obter a melhor intensidade de íons oxônio específicos dos glicanos. Dois métodos apresentaram os melhores resultados e então as proteínas padrão foram analisadas em triplicata. Met. I - MS1 600-2000 m/z; MS2 100-900 m/z - 4 janelas MS1; Met. II - MS1 600-2000 m/z; MS2 100-1600 m/z - 4 janelas MS1. A análise das glicoproteínas padrão mostrou que é possível quantificar de forma relativa a glicosilação usando íons oxônio dos glicanos gerais (mz138.05; mz186.07; mz204.08) e dos ácidos siálicos - NeuAc (mz292.10; mz274.09) e NeuGc (mz308.09; mz290.08). A comparação entre as amostras controle e tratadas com PNGaseF mostrou uma diminuição significativa das intensidades de íons oxônio específicos dos glicanos.

Conclusão: O método apresentado neste trabalho é rápido, preciso e pode ser usado para avaliar o perfil de glicosilação de glicoproteínas e outras biomoléculas.

Apoio financeiro: FAPESP /CAPES. Agradecemos ao núcleo BIOMASS (CEFAP-USP) pelas análises de LC-MS.

O PAPEL DA ENZIMA OLIGOSSACARILTRANSFERASE NA MAQUINARIA DE N-GLICOSILAÇÃO DO *Trypanosoma cruzi*. Trajano-Silva, L.A.M.¹, Mule, S.N.¹, Barboza, B.R.¹, Santos, D.M.¹, Souza-Silva, G.², Colli, W.³, Alves, M.J.M.³ and Palmisano, G.^{1,4,*}. ¹Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo – Laboratório de Glicoproteômica – São Paulo – Brasil; ² Departamento de Parasitologia – Instituto de Ciências Biomédicas II – Universidade de São Paulo – Laboratório de Células Dendríticas – São Paulo – Brasil; ³ Departamento de Bioquímica – Instituto de Química - Universidade de São Paulo – Laboratório de Bioquímica de Parasitas – São Paulo – Brasil; ⁴School of Natural Sciences – Macquarie University – Sydney - Australia

Introdução e objetivos: As modificações pós-traducionais, como a glicosilação, têm sido estudadas para entender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na interação patógeno-hospedeiro. Em tripanossomatídeos, a enzima oligossacariltransferase (STT3) é responsável por transferir um oligossacarídeo pré-montado de alta manose para resíduos de asparagina de polipeptídeos nascentes que entram no lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER). Em *T. brucei*, a subunidade STT3 foi descrita com três genes parálogos completos e, após silenciamento por interferência de RNA dos genes *TbSTT3A* e *TbSTT3B*, os parasitas mostraram redução significativa de N-glicanos. No entanto, em *T. cruzi*, a função biológica desta enzima permanece não caracterizada. Os dados apresentados aqui mostram a caracterização funcional e biológica de *TcSTT3* usando o sistema CRISPR/Cas9.

Métodos e Resultados: Com base na versão 52 do genoma da cepa Y C6 disponível no TritrypDB, identificamos sete sequências do gene *TcSTT3* *in tandem* no cromossomo 30, e a análise por expressão gênica mostrou a presença de dois parálogos: seis cópias do parálogo 1 e uma cópia do parálogo 3. Desenhamos dois RNAs guia (sgRNA) para reconhecer as UTRs 5' e 3', e a recombinação homóloga foi feita usando um DNA doador contendo um gene puromicina e uma sequência de *tag* 3-c-myc. Os parasitas foram clonados por diluição serial, e o DNA total foi extraído para confirmar o nocaute de *TcSTT3*. Quatro clones confirmaram a inserção do DNA doador por PCR e a diminuição da expressão do gene *TcSTT3* por RT-qPCR. A citometria de fluxo e os imunoblots de lectina mostraram uma redução na Concanavalina A (ConA). ConA é uma lectina que reconhece manose, e essa redução sugere alterações no repertório do glicoma. O crescimento dos parasitas em comparação com a célula de controle. Por fim, a análise proteômica foi realizada para identificar as vias moleculares diferencialmente moduladas após o nocaute de *TcSTT3*. Um total de 2.106 proteínas foram quantificadas, e 159 proteínas reguladas foram selecionadas usando ANOVA com correção de Benjamini-Hochberg (FDR < 0,05). A análise de componentes principais (PCA) mostrou uma separação clara entre o controle e os quatro clones. A análise de processos biológicos mostrou proteínas associadas a citoesqueleto, e processos mitocondriais e metabólicos. Mais estudos serão realizados sobre o papel da função STT3 durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, incluindo a metaciclogênese, adesão e infecção em células hospedeiras.

Conclusão:Esses resultados fornecerão novas informações sobre a especificidade dos parálogos *TcSTT3* e o papel da N-glicosilação na biologia do *T. cruzi*.

Apoio Financeiro: FAPESP (2018/18257-1 (GP), 2018/15549-1 (GP), 2020/04923-0 (GP); 2022/00796-9 to LAMTS; 2021/14179-9 to DMS; 2021/14751-4 to SNM; 2022/09915-0 to BRB).

Importância dos genes LINF_230006100 e LINF_310036100 na virulência e abundância de ácido siálico em *Leishmania infantum*

CAVALCANTE, T.; MULE, S.N.; SOUZA-SILVA, A.G., BARBOSA G.R.; MARQUES, A.M.; BOSCARDIN, S.B; PALMISANO, G; STOLF, B.S. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas II - USP.

Introdução e objetivos:

Diversas espécies de *Leishmania* são agentes etiológicos da leishmaniose, uma das doenças parasitárias mais importantes no mundo. Os promastigotas de *Leishmania*, formas transmitidas pelo inseto vetor, são recobertos por um glicocálice composto por glicoconjugados, que desempenha importante papel na infectividade e sobrevivência do parasito. O ácido siálico (Sias) é um monossacarídeo frequentemente encontrado em resíduos terminais de glicoproteínas e glicolipídios. O papel de Sias em infecções *in vitro* por protozoários como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania donovani* foi demonstrado em estudos anteriores. Nossos dados prévios também mostram a importância de Sias para a entrada de *L. amazonensis* e *L. infantum* em macrófagos murinos e células de linhagem humana THP-1. No entanto, informações a respeito dos mecanismos de aquisição de Sias em *Leishmania* são escassas e não há estudos demonstrando o seu papel em ensaios *in vivo* no mamífero ou no vetor. Por esta razão, o presente trabalho teve como principal objetivo nocautear dois genes - LINF_310031600 e LINF_230006100 - potencialmente envolvidos na aquisição de ácido siálico e compreender seu papel na infecção por *Leishmania*.

Métodos e resultados:

Buscamos potenciais alvos da via de Sias no genoma de *Leishmania* através da análise de domínios conservados presentes em enzimas da via de Sias de mamíferos. Identificamos o gene LINF_310031600, que potencialmente tem função de NANP, a qual em mamíferos está relacionada com formação do ácido livre, e LINF_230006100, com domínio semelhante a CMAS, responsável pela ativação da molécula de ácido siálico no núcleo da célula. Realizamos o nocaute dos dois genes por Crispr-Cas9 e analisamos o padrão de sialilação por citometria de fluxo. Observamos que promastigotas nocauteados têm maior nível de ácido siálico na superfície comparado aos parasitos selvagens ou expressores de Cas-9. Linhagens

add back para os dois genes estão em construção. Em breve infecções de macrófagos *in vitro* e de camundongos BALB/c (*in vivo*) serão realizadas com nocautes, *add backs*, selvagem e Cas9. Adicionalmente, analisaremos a capacidade de colonização dos mutantes em flebotomíneos, vetores responsáveis pela transmissão do parasito para o mamífero.

Conclusão:

Os dados obtidos nos mostram que os genes LINF_310031600 e LINF_230006100 não são essenciais para a sobrevivência de *L. infantum in vitro*. Os resultados ainda são insuficientes para afirmarmos o papel dos genes em estudo na síntese de Sias. Com a obtenção das linhagens *add back* poderemos avaliar o papel dos genes LINF_310031600 e LINF_230006100 nas infecções por *L. infantum in vitro* e *in vivo*.

Apoio financeiro:

Este trabalho tem sido realizado com auxílio das agências de fomento CAPES, FAPESP e CNPq.

ESTUDANTES DE GRADUAÇÃO

ORGANOSELÊNIO LQA_78 INIBE A MELANIZAÇÃO DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

BRUJAS, L.D.^a, DE JESUS, D.F.F.^a, DE OLIVEIRA, I.M.^b, STEFANI, H.A.^b, ISHIDA, K.^a,
^aDepartamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP, ^bFaculdade de Ciências Farmacêuticas-USP

Introdução: *Cryptococcus neoformans* é um fungo causador da criptococose que infecta mais 278.000 indivíduos anualmente, afetando principalmente os pacientes imunocomprometidos. O tratamento da criptococose é limitado a poucas opções antifúngicas que somados a alta toxicidade e custo, torna a prospecção de novas alternativas farmacêuticas imprescindível para a saúde pública. A identificação de moléculas com potencial antifúngico levou ao destaque compostos à base de selênio que apresentam atividade antimicrobiana. **Objetivos:** Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial inibitório do organoselênio LQA_78 na melanização de leveduras de *C. neoformans* e seu efeito sobre a enzima lacase. **Métodos e Resultados:** Por meio do protocolo de microdiluição em caldo do CLSI (M27M44S) determinou-se a CI_{50} (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CI_{90} (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a CFM (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do composto LQA_78 sobre leveduras de *C. neoformans*. Além disso, observou-se que tanto a CI_{50} quanto a CI_{90} do LQA_78 inibiu a melanização das leveduras de *C. neoformans* em meio mínimo sólido contendo L-DOPA com incubação por até 72h. Este evento pode estar relacionado com a redução da expressão da lacase em sal de asparagina, pois as leveduras tratadas em meio indutor da expressão da lacase tiveram a produção de melanina reduzida, enquanto que não foi observada a inibição enzimática da lacase obtida do sobrenadante pelo organoselênio LQA_78. **Conclusão:** Conclui-se que o LQA_78 tem efeito fungicida nas leveduras de *C. neoformans* e inibe sua melanização, um dos principais fatores de virulência do fungo, mas não inibe a atividade da enzima lacase, sugerindo que o LQA_78 atua durante a indução da expressão da lacase.

Apoio Financeiro: CAPES, FAPESP, CNPq

(2019/19435-3) do professor Dr. Carlos Frederico Martins Menck (ICB/USP/Microbiologia).

EXPLORING THE ROLE OF HEME OXYGENASE-1 IN MODULATING FERROPTOSIS-INDUCED CELL DEATH IN NEOPLASTIC CELL LINES

Andrade, I. A. M.¹, de Souza I.¹, Rocha C. R. R.¹, Friedmann-Angeli J. P.²

¹Departamento de Oncologia Clínica e Experimental, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

²Rudolf-Virchow-Zentrum, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Introduction and Objectives

The enzyme heme oxygenase-1 (HMOX1) catalyzes the conversion of heme to biliverdin, releasing carbon monoxide and ferrous iron. HMOX1 activity has been described as protective due to the cytotoxicity of heme and the antioxidant capacity of biliverdin. However, when excessive, it can increase free iron levels and generate reactive oxygen species (ROS). Thus, HMOX1 has been linked to ferroptosis, a type of cell death characterized by the accumulation of lipid peroxides and dependent on free iron. Nevertheless, the complex role of HMOX1 in ferroptosis modulation remains to be fully elucidated. Therefore, this project aims to deepen the analysis of the dual role of HMOX1 by characterizing human melanoma cell lines (A375) overexpressing and knocked out for the gene under the influence of ferroptosis inducers.

Methods and Results

First, we analyzed the response of wild-type (WT) cell lines to treatment with a heme analog: hemin. Since this compound can induce the expression of HMOX1 and can be used as a substrate for the enzyme, we expected an increase in intracellular iron levels, which was confirmed using the FerroOrange probe. Free iron can generate ROS via the Fenton reaction, which is central to ferroptosis. Thus, treatment with hemin and a ferroptosis inducer was expected to make the cells more sensitive, which was confirmed by viability assays using the AlamarBlue reagent. The HMOX1 KO cell lines were then observed; viability and colony formation assays showed that these cells were more sensitive to hemin than WT cells, which was expected due to the absence of the enzyme to process the compound. Surprisingly, however, the HMOX1 KO demonstrated to be significantly more resistant than the WT when applied the combined treatment with a ferroptosis inducer. Lipid peroxides were also assessed through the BODIPY probe, and indicated that hemin prevented the lipid peroxidation induced by the ferroptosis inducer in the knockout lineages. A GPX4-HMOX1 double KO cell line was

used to validate hemin's protective effect, which was again demonstrated in this model. In order to confirm the influence of HMOX1's activity and intracellular localization on the observed phenotype, we also developed mutants which were evaluated by viability assays and microscopy techniques.

Conclusion

The results indicate that in wild-type cell lines, treatment with hemin increases intracellular iron levels and susceptibility to ferroptosis. However, in the absence of HMOX1 or in case of its inactivation, hemin exerts a specific protective effect to ferroptosis. Although further studies are needed to fully address this issue, we believe that these findings are relevant in elucidating mechanisms of cell death resistance and could be applied in the matter of alternative therapies for resistant neoplasms.

Financial support

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grants #2023/15341-0; #2022/14035-0; #2019/19435-3; #2023/04397-4; #2021/11597-4

AS COLEÇÕES DO MUSEU DE ANATOMIA PROFESSOR ALFONSO BOVERO: UMA PESQUISA NOS REGISTROS

SOUSA. S. C.

MUSEU DE ANATOMIA HUMANA - INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS-USP

Introdução e Objetivos: A partir da necessidade de melhor identificação e localização das peças presentes no museu de anatomia, foi iniciado o processo de catalogação, usufruindo dos antigos registros feitos quando o mesmo residia na faculdade de medicina da USP. Com o trabalho em andamento e possuindo resultados positivos, surgiu a ideia do projeto de pesquisa “As coleções do museu de anatomia professor Alfonso Bovero: Uma pesquisa nos registros”, com o objetivo de discutir os modelos de catalogação da época e fazer a contextualização entre as peças e as informações existentes sobre as mesmas. **Métodos e Resultados:** As metodologias usadas neste projeto de pesquisa são o levantamento bibliográfico e pesquisa descritiva exploratória. A pesquisa bibliográfica, neste trabalho, consiste em buscar informações em publicações das áreas trabalhadas no projeto, ciência da informação e anatomia, como também na busca de dados referente às peças e obras descritas. Já a pesquisa descritiva exploratória tem como foco, a busca e uso do tema trabalhado, os registros e obras de Alfonso Bovero. **Resultados:** Com a junção de duas áreas inicialmente, bem distintas, foi possível que peças de estimado valor para o museu, tivessem seus status ainda mais alavancados, já que informações importantes como: idade, raça, nacionalidade, e época vivida foram recuperadas a partir do estimado trabalho de ex-profissionais da biblioteconomia. **Conclusão:** A presente pesquisa se conclui com a convicção de que peças não são apenas peças, e sim, pessoas, essas que possuíam: histórias, famílias, e ideias. E a partir dos trabalhos em conjunto da ciência da informação e da arte da conservação anatômica, essas histórias estão e estarão vivas e lembradas por um longo tempo.

ESTUDO DE MECANISMOS NEUROPROTETORES DA BERBERINA EM ANIMAIS HIPERGLICÊMICOS.

Maretti 1, J.G., Bressan 2, L.C., Amaral 3, M.E.C.

1- Curso de biomedicina, Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto, FHO, Araras, SP, Brasil.

2- Curso de farmácia, Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto, FHO, Araras, SP, Brasil.

3- Núcleo de Ciência da Saúde, Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto, FHO, Araras, SP, Brasil.

Introdução e Objetivos

O diabetes mellitus do tipo 1 é uma doença crônica caracterizada pela ineficiência do organismo em produzir insulina por conta da perda das células beta pancreáticas levando ao quadro de hiperglicemia e cetoacidose diabética. A redução da oxigenação do sistema nervoso central caracteriza-se como a complicação mais grave da cetoacidose diabética. A berberina é uma planta da família *Berberis* muito estudada pela medicina chinesa com funções hipoglicemiante e hipocolesterolêmica. Demonstra-se capaz de atenuar o processo inflamatório, agir como antioxidante e neuroprotetora. O estudo tem como objetivo analisar o efeito da berberina no auxílio do tratamento do diabetes do tipo 1 especificamente como ação neuroprotetora em células hipotalâmicas.

Métodos e Resultados

Aprovado pelo comitê de ética da Fundação Hermínio Ometto (nº 026/2022); dividimos 30 ratos *Wistar* em 3 grupos, sendo eles o grupo controle (C), o grupo diabético (D), ambos tratados com o veículo carboximetilcelulose 0,5%, e o grupo diabético tratado com berberina (DB) na dose de 210 mg/kg/dia dissolvida em solução de carboximetilcelulose 0,5%. O diabetes foi induzido por aloxana via veia intraperitoneal nos grupos D e DB. Após a caracterização do diabetes, glicemia acima de 300mg/dL, foi realizada a suplementação com berberina por um período de 15 dias. Em seguida os animais foram eutanasiados e o hipotálamo foi retirado inteiro e armazenado para análises histológicas, imuno-histoquímicas e de western blotting. No geral não houveram mudanças histológicas nas células do tecido hipotalâmico pela coloração de H/E. Foi realizada a imuno-histoquímica com os anticorpos PLP para marcação de mielina, GFAP para marcação de astrócitos e o IBA-1 para marcação de micróglia e também não foram observadas alterações entre os grupos. Já a expressão proteica do anticorpo CD4 (marcador de linfócitos T) demonstrou redução para o grupo DB comparado aos grupos C e D. A expressão dos anticorpos CD8 (marcador de linfócitos T) e catalase (marcador antioxidante) foram similares para todos os grupos. O projeto se encontra em andamento para análise e obtenção de mais dados.

Conclusão

Até o momento, não foi possível correlacionar a suplementação da berberina com mecanismos de ação de neuroproteção em células hipotalâmicas.

Apoio Financeiro: Bolsa PIC/Programa de Iniciação Científica do Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto.

OUTROS

ENHANCING SERS-RAMAN SPECTROSCOPY FOR IMPROVED CHARACTERIZATION OF EXTRACELLULAR VESICLES IN CANCER CELL BIOLOGY

Batista, M.L.S.*^{1,2,3}; Clavo, R. A.O.*²; Fernandes, L.A.²; Nakamura, M.; Nogueira, H.P.²; Araki, K.²; Carrera, A.C.O.^{2,4}

1. Paulista School of Medicine/Federal University of São Paulo (EPM-UNIFESP), Brazil;
2. University of São Paulo (USP), Chemistry Institute, Brazil;
3. Butantan Institute (IB), Brazil;
4. Federal University of ABC (UFABC), Brazil

*Same contribution

INTRODUCTION: Studies on Extracellular Vesicles (EVs) highlight their significant therapeutic potential and contributions to the knowledge of cell biology in *in vitro* and *in vivo* environments, whose impacts on cancer biology have demonstrated a crucial role in modulating tumour processes, as well as communication at the location and distance from the carcinogenic process. Therefore, the use of effective analytical techniques is imperative to comprehensively characterise and classify EVs, ranging from their surface chemical composition to their internal content, with the use of bioinformatics tools using omics. In the meantime, using triple negative breast cancer (TNBC) as a study model, EVs were isolated from several cell line conditioned media using the ultrafiltration method, followed by PEG precipitation, in a new protocol developed by our company. group, under patent application, being subsequently subjected to varied characterizations (nanoparticle tracking analysis-NTA, scanning electron microscopy-SEM, western blot), in addition to chemical characterization using spectroscopic techniques as elucidated in the literature, despite the results are not satisfactory in relation to the reproducibility and reliability of the spectra obtained. **OBJECTIVES:** For this reason, to guarantee precision and reproducibility, Raman spectroscopy, together with Au and Ag nanoparticles (NPs), are incorporated together with EVs, given that the interaction of NPs with EVs, of size from 10 to 15 times larger, they can create a plasmonic effect of amplification of the Raman signal, called SERS-Raman spectroscopy. **METHODOLOGY:** In order to use data already published in the literature, a protocol was developed and validated in our laboratory to increase the reproducibility of results with the use of AuNP+EVs and compare its results with the use of AgNP+EVs, such as already validated in the literature and with unsatisfactory results. Dark Field Hyperspectral Microscopy (Cytoviva) was used to monitor the real-time interaction of EVs with Au and AgNPs, under the effect of Raman measurement of the NPs, confirming the vesicular integrity and chemical interactions on the surface of the EVs. Furthermore, Confocal Raman Microscopy (Witec) characterised Au and AgNPs+EVs at 532 nm and 633 nm lasers, using a drip casting technique on a glass slide, under drying at room temperature. **RESULTS:** The spectrum obtained allowed the evaluation of the surface chemical compositions of EVs, highlighting specific peaks of organic groups of relevance to a liposome, which suggests a variation depending on the EV analysed. **CONCLUSIONS:** Therefore, we were able to propose a new study platform for EVs, creating new alternatives for characterising their surfaces with more precise spectroscopic techniques.

FINANCIAL SUPPORT: FAPESP, CNPq, CAPES, FINEP.

Keywords: EVs, TNBC, Spectroscopy, NPs

INVESTIGATION OF SIGNALLING PATHWAYS AND GENES NETWORKS PLAYED BY CD90/THY1 IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER (TNBC) IN A TRANSLATIONAL PERSONALISED MEDICINE

Batista, M.L.S.^{1,2,3}, Ramasamy,D.P.K.², Lobba,A.R.M.³, Sogayar,M.C.², Junior, M.Y.N.³, Carrera,A.C.O.^{2,4}

1. Paulista School of Medicine/Federal University of São Paulo (EPM-UNIFESP), Brazil;
2. University of Sao Paulo (USP), Chemistry Institute, Brazil;
3. Butantan Institute (IB), Brazil;
4. Federal University of ABC (UFABC), Brazil.

INTRODUCTION: Breast cancer is the most prevalent type of tumour in the world, and the second in Brazil, with triple-negative (TNBC) being the most aggressive subtype of them all, with no specific therapeutic target to date. In the meantime, our group studying the CD90 biomarker demonstrated promising results of this glycoprotein through *in vitro* and *in vivo* assays, possibly representing a promising diagnostic and therapeutic target for patients with TNBC. However, the complex interactions between CD90 and its association with other signalling pathways remain elusive. **OBJECTIVES:** To address this knowledge gap, we employed a total transcriptomic and proteomics approach using a CD90-edited TNBC-derived cell line model. **METHODOLOGY:** Differentially Expressed Genes (DEGs) were identified using the DESeq2 and edgeR methods, applying specific criteria for Fold Change (FC) and False Discovery Rate (FDR). DEG-based enrichment analysis was conducted for each treatment of MCF10A/CD90+ (A) and Hs578T/shCD90 (B) cell lines using the EnrichR tool with the KEGG+Reactome database. A new RNA-seq analysis strategy was proposed based on cellular model assays and gene sets selected from molecular signature databases (MsigDB). Each analysis was performed using the fgSEA software, considering the expression profiles in the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) and groups identified by PCA. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was further conducted to integrate pathways enriched with PCA results. Furthermore, based on current literature, a list of genes and canonical pathways related to TNBC was assembled and used as a model validation step, and its results after enrichment and biological correlations. **RESULTS:** Based on existing literature, we identified 151 canonical genes and 65 pathways associated with TNBC. 14 canonical genes were identified from the DEGs in set A, while only 3 were found for set B. PCA analysis revealed two distinct groups of pathway sets segregating cells A and B, highlighting five critical pathways involved in contrasting biological processes in relation to the overexpression of CD90 and its inhibition in the cellular models studied, as well as in *in vivo* assays, there was proof of concept of the phenotypic change of CD90+ or CD90- cells. **CONCLUSIONS:** Thus, RNA-seq results aim to identify overexpressed and co-expressed genes, offering insights into the specific mechanisms that drive the phenotypes of our edited cell model, aiming to better understand the pathways and genes related to the functioning of CD90 in the process normal and pathological cellular, as there is no understanding of how it manages to modulate carcinogenesis and it is related to the worst types of tumours, as already evidenced by the literature for different tumour types.

FINANCIAL SUPPORT: FAPESP, CNPq, CAPES, FINEP.

Keywords: TNBC, breast cancer cell model, biomarker, CD90

CATALOGAÇÃO DE PEÇAS ANATÔMICAS: METODOLOGIAS E IMPORTÂNCIA PARA A PESQUISA CIENTÍFICA

Cardoso, N., Ferreira, P., Garcia, P., Liao, L., Miamoto, M., Pinheiro, C., Riganti, J., Santana, G., Santos, G., Silva, A., Silva, M., Souza, N., Souza, S., Lacchini, S., Liberti, E., Museu de Anatomia Humana, Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Introdução e Objetivos: A catalogação de peças anatômicas em museus desempenha um papel fundamental na preservação do patrimônio científico e histórico. Instituições museológicas, como o Museu de Anatomia Humana Prof. Alfonso Bovero do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (MAH), enfrentam o desafio de manter e atualizar extensos acervos, garantindo que informações valiosas sobre cada peça sejam preservadas para futuras gerações. Com o advento de tecnologias digitais, novas metodologias de catalogação têm sido desenvolvidas para modernizar e informatizar esses acervos, proporcionando maior acessibilidade e preservação. O presente estudo tem por objetivo avaliar as metodologias de catalogação de peças anatômicas no Museu de Anatomia Humana Prof. Alfonso Bovero do ICB-USP (MAH), bem como sua importância para a pesquisa científica e a preservação do conhecimento. **Métodos e Resultados:** A pesquisa examina a implementação de sistemas digitais para a modernização e informatização do acervo do MAH. A catalogação digital abrange a descrição detalhada das peças, datação, procedência, autoria da preparação de cada peça, local de origem e um acervo de fotografias. Adicionalmente, são considerados métodos tradicionais, como fichas históricas datilografadas e livros produzidos pelos anatomistas da época. A digitalização do acervo é fundamental para a preservação das informações originais, frequentemente registradas em materiais antigos e vulneráveis à deterioração. A centralização das informações em um sistema digital facilita estudos comparativos, permitindo o acesso rápido e eficiente aos dados, tanto das peças expostas quanto das que estão na reserva técnica. Este processo promove uma evolução contínua e modernização do museu, ao identificar lacunas e áreas que necessitam de melhorias. Além disso, a catalogação digital simplifica a localização de peças específicas, como aquelas preparadas pelo próprio Prof. Alfonso Bovero, sendo vital para pesquisas futuras. **Conclusões:** Conclui-se que os métodos de catalogação são essenciais para preservar e imortalizar o acervo do museu, assegurando a continuidade do conhecimento científico. A digitalização do acervo permite uma gestão mais eficiente e maior acessibilidade aos dados, promovendo a preservação do patrimônio histórico e científico do MAH, bem como ampliando o diálogo com outras instituições.

Palavras-chave: Catalogação digital; preservação do conhecimento; pesquisa científica; Museu de Anatomia Humana; modernização de acervos.

ESTUDO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE PORFIRINAS CATIÔNICAS NA INATIVAÇÃO DE PATÓGENOS MICROBIANOS EM LEITE

Torres-Chipana¹ M. M., Gidlund^{1,2} M. A., Baldini³ R. L., Azzellini⁴ G. C.

¹Interunidades em Biotecnologia – ICB, IB, FMVZ, EP– USP; ²Departamento de Imunologia – ICB IV - USP; ³Departamento de Bioquímica – IQ – USP; ⁴Departamento de Química Fundamental – IQ – USP.

Introdução e Objetivos: Os tratamentos com antibióticos na mastite bovina interrompem a produção do leite por longos períodos e acarretam o desenvolvimento de resistência destes microrganismos. A Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (APDT) emerge como uma alternativa atrativa ao uso de antibióticos no tratamento de infecções microbianas, sendo baseada em processos oxidativos estimulados por luz. O objetivo desta pesquisa é investigar a ação fotodinâmica de porfirinas e metaloporfirinas catiônicas na inativação de *S. aureus* e *E. coli* isoladas de mastite bovina em leite.

Métodos e Resultados: Foram utilizadas duas porfirinas catiônicas TMPyP (*meso*-Metilpiridinium)-Porfirina) e TBzPyP (*meso*-Benzilpiridinium)-Porfirina) e seus respectivos complexos metálicos de Zn(II) (ZnTMPyP e ZnTBzPyP). *S. aureus* e *E. coli* foram crescidas em meio Luria Bertani (LB) a 37°C *overnight* e depois ajustadas em $10^7 - 10^8$ UFC/mL. Estudos de fotoinativação em leite foram realizados em placas de ágar LB irradiando com lâmpada tungstênio-halógena de 300 W por 30 minutos. Experimentos de fotoinativação foram comparados com os respectivos controles. Este trabalho foi submetido ao comitê de ética: CEP-ICB nº 1014/2019. Em relação aos resultados com *E. coli*: na ausência de leite TMPyP e TBzPyP foram efetivas na fotoinativação total, apresentando queda de 7log enquanto em leite a ação fotodinâmica é dependente da concentração utilizada. A TMPyP apresentou fotoinativação total a partir de 5×10^{-5} M, a TBzPyP por sua vez nesta concentração apresenta inativação de 3log, sendo a inativação total obtida em uma concentração de 2×10^{-4} M. As zinco porfirinas, apresentaram resultado similar em PBS, mostrando inativação total. Entretanto em leite tanto a ZnTMPyP como a ZnTBzPyP mostraram-se menos efetivas com uma queda de 3log independentemente da concentração utilizada no intervalo de 5×10^{-6} M à 2×10^{-4} M. Enquanto a *S. aureus*: tanto as porfirinas como as zinco porfirinas utilizadas foram eficazes na fotoinativação de *S. aureus* em leite, sendo obtida a fotoinativação total em concentrações consideravelmente mais baixas (TMPyP: 2×10^{-5} M; TBzPyP: 1×10^{-6} M; ZnTMPyP: 1×10^{-7} M; ZnTBzPyP: 2×10^{-7} M) que no caso de *E. coli*.

Conclusão: Os compostos porfirínicos investigados fotoinativam os microrganismos em leite, sendo particularmente efetivos para *S. aureus* em concentrações micro molares. Os resultados em leite para *E. coli* demonstram que a interação dos compostos porfirínicos é dificultada, sendo necessárias maiores concentrações para o efeito fotodinâmico.

Apoio Financeiro: Fapesp, Capes

ESTUDO DAS FIBRAS COLÁGENAS NO COLO DISTAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A COLITE ULCERATIVA EXPERIMENTAL

Paulo, C.B.¹, Caetano, M.A.F.², Souza, R.F.², Castelucci, P.², ¹Departamento de Cirurgia/FMVZ; ²Departamento de Anatomia, Instituto de Ciências Biomédicas-USP

Introdução e Objetivos

As doenças inflamatórias intestinais (DII) são condições idiopáticas que provocam inflamação do trato gastrointestinal (Shapiro *et al.*, 2016). Entre as DIIs, a colite ulcerativa é caracterizada por ciclos de inflamação e remissão, com sintomas de vômito, dor abdominal e diarreia intermitente (Sairenji *et al.*, 2017). Também há alterações na matriz extracelular, como a fibrose, que gera deposição de colágeno e prejudica a motilidade gastrointestinal (Zhao *et al.*, 2020). Este projeto objetiva quantificar fibras colágenas na colite ulcerativa por coloração de Picrosirius Red.

Métodos e Resultados

Camundongos machos C57BL/6 *Wild Type* foram divididos em grupos (Sham e Colite, n=5). A inflamação no grupo Colite foi induzida com 2, 4, 6, ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) a 1,5% diluído em 35% de etanol, e etanol no grupo Sham, injetados no lúmen do intestino grosso. Os animais foram acompanhados por 7 dias para avaliar o Índice de Atividade da Doença (IAD) e, após esse período, foram eutanasiados (CEUA 4333241123).

Para análise histológica, os tecidos do colo distal foram corados com Picrosirius Red e a análise foi realizada com um microscópio Nikon 80i sob luz óptica e polarizada. Fibras colágenas tipo III foram observadas em amarelo-esverdeado e tipo I em laranja-avermelhado em luz polarizada. A quantificação das fibras colágenas sob luz óptica foi feita com o *software* Image J, pela função *RGB Stack*, pelo canal *Green*, e o *Threshold* para ajustar e, em seguida, mensurar. Foram analisadas 10 seções (n=5) para mucosa, submucosa e gânglio mioentérico. A análise estatística foi feita pelo Teste t ($p>0,05$).

Os resultados demonstram: o IAD do grupo Colite apresentou pontuações maiores comparado ao grupo Sham. Houve maior deposição de fibras colágenas na mucosa, submucosa e no contorno dos gânglios do grupo Colite comparado ao grupo Sham. Em luz polarizada, as fibras colágenas tipo III mostraram mais intensas nos animais do grupo Colite comparado ao grupo Sham. A quantificação das fibras colágenas na mucosa revelou aumento de 19,47% ($p>0,05$) do grupo Colite ($0,32 \pm 0,07$) em relação ao grupo Sham ($0,27 \pm 0,06$), na submucosa houve aumento de 32,34% ($p>0,05$) do grupo Colite ($0,35 \pm 0,08$), em relação ao grupo Sham ($0,26 \pm 0,07$), e no gânglio, aumento de 34,32% ($p>0,05$) do Grupo Colite ($0,43 \pm 0,09$), comparado ao grupo Sham ($0,32 \pm 0,11$).

Conclusão

A análise qualitativa e quantitativa indica maior deposição de colágeno nas camadas de mucosa, submucosa e gânglio do grupo Colite, sugerindo desenvolvimento inicial de fibrose.

Apoio Financeiro

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brasil) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil).

PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE ANTÍGENOS PROTEICOS A PARTIR DE ANTICORPOS MONOCLONAIS POR DOCKING MOLECULAR

Barreiros, G. M., Manieri, T. M., Laboratório de Biofármacos, Instituto Butantan.

1. Introdução e Objetivos

Métodos *in silico* são uma escolha cada vez mais crescente na avaliação e caracterização da interação antígeno-anticorpo, devido ao constante avanço das ferramentas de bioinformática. Ferramentas como o *docking* permitem realizar a predição do complexo antígeno-anticorpo e assim avaliar os resíduos que compõem essa interação. O objetivo deste trabalho é estabelecer uma metodologia para predição de epítopos *in silico*. Para isso, serão descritos métodos de avaliação e preparo das estruturas para a realização do *docking*, bem como para obtenção da estrutura 3D do anticorpo por homologia e, finalmente, para identificação dos resíduos de ligação.

2. Métodos e Resultados

A determinação de epítopos se inicia pela análise das sequências dos anticorpos, identificando as regiões de interesse na porção variável (Fv) do anticorpo: região *framework* e região determinante de complementaridade (CDR). Para realização do *docking* molecular é necessário a estrutura 3D dos mAbs que pode ser obtida por homologia. A predição da estrutura 3D é baseada na modelagem Fv dos mAbs, região de interação com o antígeno. Neste trabalho, a homologia foi realizada na plataforma *ABodyBuilder* alimentada com as sequências de aminoácidos das cadeias variáveis. Para o *docking* molecular, a estrutura do anticorpo deve ser preparada conforme requisitos da plataforma HADDOCK 2.4. Nesse caso, as sequências da estrutura Fv dos anticorpos devem ser reconhecidas como uma única cadeia e que a numeração dos resíduos seja normalizada apenas com números. Em relação ao antígeno, pode-se obter a estrutura 3D no *Protein Data Bank* (PDB). A estrutura do antígeno também deve ser preparada, de modo que sejam retiradas as moléculas de água, íons e átomos não protéicos. O *docking molecular* é realizado com os parâmetros definidos pela plataforma, seguida da inclusão dos resíduos ativos do anticorpo, as CDRs. Os complexos obtidos no *docking* devem então ser avaliados para identificação dos resíduos que compõem a região de ligação entre o anticorpo e o antígeno. Para isso utiliza-se o software LigPlot+, que identifica os resíduos da interface que apresentam ligação de hidrogênio e/ou ligações hidrofóbicas. Estabelecendo uma frequência dos resíduos encontrados é possível determinar quais deles têm a maior probabilidade de serem componentes do epítipo.

3. Conclusão

Metodologias capazes de caracterizar a estrutura e ação desses anticorpos são uma ótima ferramenta para o desenvolvimento e aprimoramento dessas moléculas. Os métodos *in silico* se mostram como uma ferramenta de suporte na triagem de anticorpos monoclonais.

Apoio Financeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biofármacos do Instituto Butantan, com auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

R-BODIES DE *XANTHOMONAS CITRI* E *CAEDIBACTER TAENOSPIRALIS*: EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.

Lopes, R.M.C., Farah, S.C., Departamento de Bioquímica, Instituto de Química-USP.

Introdução e Objetivos

R-bodies, ou corpos refráteis, são estruturas proteicas poliméricas primeiramente caracterizadas na bactéria *Caedibacter taenospiralis*. Quando expostos a pH ácido, R-bodies mudam drasticamente de conformação e tamanho, passando de uma fita enrolada de 0.5 µm para uma estendida que pode ultrapassar 4 µm. Homólogos dos genes *reb*, que codificam os componentes principais dos R-bodies, estão amplamente distribuídos no filo Proteobacteria, estando presentes no genoma de *Xanthomonas citri*, um fitopatógeno de importância econômica no Brasil. Pouco sabemos sobre o papel fisiológico de R-bodies e não há informação sobre estas proteínas em bactérias da ordem Xanthomonadales. Neste projeto, visamos estudar os R-bodies de *C. taenospiralis* e de *X. citri* por meio de várias técnicas, incluindo a expressão heteróloga em *Escherichia coli*, purificação e análise em microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e criomicroscopia eletrônica de transmissão (Cryo-EM).

Métodos e Resultados

Foram utilizados dois plasmídeos disponíveis no laboratório, um vetor de expressão que codifica os homólogos de *X. citri* (Sophia Quarello, Germán Sgro e Chuck Farah, não publicado) e um plasmídeo que possui o *reb* cluster completo de *C. taenospiralis* (Polka e Silver, 2016). As cepas de *E. coli* DH5α e BL21(DE3) foram utilizadas para replicação dos plasmídeos e expressão dos R-bodies recombinantes, respectivamente, sendo a cultura da primeira para extração plasmidial e a segunda para indução da expressão com IPTG. A purificação dos R-bodies recombinantes se baseou em sua insolubilidade e resistência à SDS. O purificado de proteínas de *C. taenospiralis* foi testado em diferentes condições de pH e concentração salina, sendo possível visualizar por TEM os R-bodies em ambas as conformações, estendida e enrolada. No entanto, quanto às proteínas de *X. citri*, não foi visto estruturas semelhantes às disponíveis na literatura de R-bodies.

Conclusão

A purificação das proteínas recombinantes de *C. taenospiralis* está satisfatória, proteína enovelada conforme visto na literatura e poucos contaminantes. A purificação dos R-bodies de *X. citri*, porém, ainda precisa ser aprimorada, há contaminantes visíveis na TEM e não foi visto nenhuma estrutura semelhante ao que esperamos para os R-bodies, embora as bandas correspondentes a eles aparecerem na amostra aplicada em gel SDS-PAGE. Não conseguimos realizar coleta de imagens das grades com R-bodies de *C. taenospiralis* na Cryo-EM devido a grossura do gelo, sendo necessário testar diferentes condições de blot para encontrar o preparo ideal dessas grades. O projeto possui alguns desafios, mas acreditamos que serão logo superados.

Apoio Financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
#2023/17618-9

FRAGMENTOS DE ANTICORPOS NO FORMATO SCFV FUNDIDOS AO DOMÍNIO SNAPTAG PARA IMUNODETECÇÃO DAS PROTEÍNAS SPIKE E NUCLEOCAPSÍDEO DO SARS-COV-2 – RESULTADOS PRELIMINARES

Silva, J.P.C.¹; Cunha, M.P.^{1,2}; Pour, S.Z.¹; Hering, V.R.¹; Neto, D.F.L.¹; Zanotto, P.M.A.¹

1. Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
2. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

Introdução e objetivos

Em dezembro de 2019, o vírus SARS-CoV-2 emergiu em Wuhan, China, inicialmente associado à uma doença respiratória que rapidamente espalhou-se em escala global, sendo associado a um grande número de óbitos, causando sérios problemas de Saúde Pública nos locais acometidos pelo vírus. Mesmo sendo um dos vírus mais estudados, as estratégias profiláticas de controle da infecção viral ainda são limitadas principalmente ao tratamento sintomático. Nesse contexto, o desenvolvimento de ferramentas de imunodeteção utilizando fragmentos de anticorpos recombinantes pode ser uma alternativa considerável. Assim, o objetivo do presente trabalho consiste no desenvolvimento de dois fragmentos de anticorpo com potencial terapêutico conjugados à um domínio SNAPTAG para a detecção através de fluorescência das proteínas estruturais Spike (S) e nucleocapsídeo (N) do vírus SARS-CoV-2.

Métodos

Para expressar e purificar os fragmentos recombinantes de *single-chain fragment of immunoglobulin variable regions* (scFv) CR3022 e scFv nCoV396 com SNAPTAG, as sequências de nucleotídeos das cadeias leves e pesadas dos anticorpos foram clonadas no plasmídeo pSNAPTAG® (T7)-2 e expressas em *E. coli* Arctic Express (DE3). Após a indução com IPTG, as células foram incubadas, coletadas por centrifugação, lisadas, e a proteína de fusão foi purificada por cromatografia de afinidade de níquel, analisada por SDS-PAGE e quantificada pelo método de *Bradford*. Para a detecção por fluorescência, os fragmentos de anticorpos foram fundidos a um domínio SNAPTAG. A reconstrução filogenética do SARS-CoV-2 utilizou o software *Nextstrain* para analisar genomas recuperados do GISAID, enquanto a modelagem molecular dos anticorpos foi feita pelo SWISS-MODEL e analisada pelo QMEAN. Os próximos passos envolvem validar a interação dos scFv com antígenos virais (epitopos, proteínas e vírus completo).

Resultados e Conclusões

Os dois fragmentos de anticorpo scFv foram desenvolvidos conjugados ao domínio SNAPTAG, para detectar as proteínas S e N do SARS-CoV-2 *in vitro*. O anticorpo CR3022 foi desenvolvido para identificar a proteína S, enquanto o nCoV396 é destinado ao reconhecimento da proteína N. A reconstrução filogenética identificou variantes do SARS-CoV-2, e a modelagem estrutural dos fragmentos foi realizada usando o SWISS-MODEL. Para os próximos passos da pesquisa, esperamos inicialmente utilizar esses fragmentos de anticorpos recombinantes em ensaios de ELISA de fluorescência para imunodeteção de epitopos e das proteínas S e N completas, bem como da partícula viral inteira. Em seguida, em nível celular, usaremos os scFv para detectar partículas virais em localizações específicas nas células permissivas à infecção viral.

Apoio Financeiro

J.P.C.S. é aluno bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O desenvolvimento do projeto está sendo realizado com recursos dos próprios pesquisadores e sem financiamento de agências de fomento.