

129

**Genoma funcional do cancro cítrico: estudo de interações patógeno-planta**

Júlio Cezar Franco de Oliveira

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal  
Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Processo 2004/02006-7

Vigência: 1/9/2004 a 31/8/2009

Visa-se a utilização de abordagens experimentais complementares para o estudo do cancro cítrico, uma doença causada pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* (XAC). Utilizando tecnologia genômica, serão investigados os perfis de transcriptoma (análise por *microarrays*) e proteoma (eletroforese 2D e espectrometria de massa) da bactéria em condição não infectante, e durante o desenvolvimento da bactéria em planta hospedeira, para a bactéria selvagem e para mutantes comprometidos na indução de sintomas típicos de cancro. Genes considerados importantes para a patogenicidade terão as respectivas proteínas expressas em *E. coli*, cristalizadas e analisadas estruturalmente. A partir das proteínas expressas serão obtidos anticorpos úteis na investigação bioquímica. A interação planta-patógeno será ainda investigada por meio de microscopia óptica (luz visível e fluorescência), com o objetivo de estudarmos as respostas celulares da planta frente à bactéria selvagem, a mutantes e à *X. a. aurantifolli* estirpe C (XAA-C), que induz resposta de resistência (HR) em laranjeira. A resposta da planta será estudada ainda a partir de bibliotecas substrativas. Os dados obtidos para a XAC serão utilizados para a análise genômica comparativa entre XAC (genoma sequenciado) e XAA-B e XAA-C (em fase final de sequenciamento completo dos genomas).

130

**Especificidade e mecanismo de catálise das oligopeptidases neurolisina, timet oligopeptidase e neprilisina: estudos de cinética enzimática associados a mutações sítio-dirigidas**

Vitor Marcelo Silveira Bueno Brandão de Oliveira

Escola Paulista de Medicina

Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)

Processo 2003/13350-8

Vigência: 1/9/2004 a 31/8/2008

A proteólise é vista atualmente como um mecanismo essencial nos processos biológicos, desde o desenvolvimento até o metabolismo. E o eventual desequilíbrio de vias proteolíticas tem clara implicação em doenças. As enzimas responsáveis pela proteólise são as peptidases (proteases ou proteínases), especializadas em catalisar a hidrólise de ligações peptídicas. Entre as peptidases, existem enzimas especializadas em degradar pequenos peptídeos (peptídeos contendo menos de 30 aminoácidos), denominadas oligopeptidases.

O presente projeto de pesquisa tem como tema central o estudo das oligopeptidases timet oligopeptidase (TOP, EC 3.4.24.15), neurolisina (EC 3.4.24.16) e neprilisina (NEP, EC 3.4.24.11). Há estudos realizados sobre a especificidade das oligopeptidases, TOP, neurolisina e neprilisina. Para esses estudos tem sido fundamental o uso de substratos sintéticos com supressão intramolecular da fluorescência. Pretende-se agora empregar mutação sítio-dirigida em associação com substratos sintéticos com supressão intramolecular da fluorescência para investigar detalhes do mecanismo pelo qual as oligopeptidases atuam sobre seus substratos – uma etapa fundamental para o entendimento de suas funções nos organismos vivos, bem como para a geração futura de inibidores e substratos específicos.

131

**Clonagem e caracterização de transportadores de aminoácidos em *Trypanosoma cruzi*: uma abordagem pós-genômica**

Ariel Mariano Silber

Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo (USP)

Processo 2003/13257-8

Vigência: 1/9/2004 a 28/2/2009

As doenças causadas por tripanossomos constituem um problema de saúde relevante nas Américas, África e na região tropical e subtropical do planeta. Na maior parte dos casos, as terapias são ineficientes e as probabilidades de cura são baixas. Porém, a terapia é um elemento essencial para o controle dessas doenças infecciosas e a descoberta de novas drogas contra organismos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* constituem objetivos de pesquisa considerados relevantes. Está demonstrada na literatura a participação dos aminoácidos na diferenciação e no metabolismo energético nesses parasitas. É importante destacar o fato de que os processos de transporte constituem um primeiro passo para o metabolismo dos aminoácidos e, portanto, tornam-se alvos alternativos importantes para o desenho de drogas. Nesse contexto, chama a atenção o fato de haver poucos estudos na literatura sobre transporte de aminoácidos. Até o presente, não foi caracterizada em nível molecular, nesses organismos, nenhum transportador de aminoácidos. No presente projeto, propõe-se caracterizar em níveis bioquímico e molecular os genes codificantes de transportadores de prolina e glutamato do *Trypanosoma cruzi* e procurar análogos de seus substratos com potencial terapêutico. Dependendo do andamento do projeto, a estratégia proposta será estendida a outro parasita importante, *Leishmania spp.*

132

***Plasmodium berghei* como modelo para o estudo da variação antigênica em malária**

Lúcio Holanda Gondim de Freitas Júnior  
Escola Paulista de Medicina  
Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)  
Processo 2003/12997-8  
Vigência: 1/7/2004 a 30/6/2008

Este projeto propõe-se identificar e estudar os mecanismos de virulência em *Plasmodium berghei* e estabelecer esta espécie como modelo para o estudo da variação antigênica em malária. Em um primeiro momento, serão identificados no banco de dados os genes candidatos a serem as proteínas teloméricas em *P. berghei*. Em seguida, será feito nocaute desses genes candidatos e teste da viabilidade desses parasitas ao longo da infecção. Outra estratégia será estudar a localização dessas moléculas fusionadas com GFP (Green Fluorescent Protein) em tempo real (*in vivo*). Como objetivos gerais pretende-se identificar as moléculas (proteínas teloméricas) que são importantes para o estabelecimento da infecção pelo parasita, assim como os mecanismos usados. Acredita-se que a utilização do *P. berguei* como modelo para o estudo da variação antigênica em malária dará uma importante contribuição nesse campo de estudo.

### 133 Estudo da atividade antioxidante da astaxantina em lipossomos unilamelares: bloqueando radicais livres e afetando a permeabilidade das membranas

Marcelo Paes de Barros  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Universidade Cruzeiro do Sul (Unicsul)  
Processo 2002/09405-9  
Vigência: 1/9/2003 a 31/1/2009

A astaxantina é um carotenoide de coloração avermelhada e um dos principais antioxidantes presentes em organismos marinhos tais como algas, crustáceos e peixes. A destacada proteção antioxidante da astaxantina se processa especialmente na interceptação de radicais peroxil (ROO.) e alcoxil (RO.) e no *quenching* de oxigênio singlete [ $O_2(1Ag)$ ]. Contudo, resultados recentes sugerem que a proteção antioxidante da astaxantina em membranas biológicas também se processa por outro mecanismo coadjuvante. Carotenoides hidroxilados ou que dispõem de grupamentos cerônicos – por exemplo, zeaxantina, astaxantina, luteína – apresentam características menos hidrofóbicas e, em decorrência disso, assumem uma orientação perpendicular ao plano delimitado pela bicamada lipídica. Essa disposição vertical da astaxantina em membranas reduz significativamente a permeabilidade da bicamada lipídica a inúmeras substâncias difusíveis, incluindo agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o óxido nítrico (NO). Consequentemente, podem ocorrer alterações substanciais na produção de espécies reativas

de oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) no espaço interno definido por aquela barreira biológica. O objetivo deste projeto é examinar essa hipótese, utilizando a astaxantina associada a lipossomos unilamelares carregados com moléculas-alvo de DNA plasmidial no ambiente aquoso interno. Dois agentes oxidantes permeáveis a membranas serão utilizados: o  $H_2O_2$  e o NO. No primeiro sistema, as espécies oxidativas serão geradas no ambiente aquoso interno por meio da reação de Fenton promovida por dois eventos sequenciais: 1) permeação do  $H_2O_2$  através da membrana lipossomal; e 2) reação com íons  $Fe_2+$  complexados ao ácido nucleico ou a EDTA (grupo controle) compartimentalizados. Em outra etapa do projeto, o ácido peroxinitroso (HOONO) – efetiva ERN promotora da lipoperoxidação – será produzido no ambiente interno dos lipossomos pela decomposição térmica (a 37°C) da 3-morfolinosisidnonimina (SIN-1), substância que gera quantidades equimolares de seus precursores superóxido ( $O_2^-$ ) e NO nessas condições. Alterações na proporção 1: 1 entre  $O_2^-$  e NO notoriamente afetam os níveis de lesões oxidativas promovidas pelo HOONO. Dessa forma, pretende-se adicionar uma fonte externa de NO (por exemplo NO no ato de espermina) na tentativa de alterar a razão equimolar entre os precursores do HOONO e assim averiguar o efeito inibitório na permeabilidade de membranas promovido pela astaxantina. Essa hipótese será estudada por meio da dosagem de parâmetros de danos oxidativos sobre lipídios e DNA. As lesões oxidativas sobre o DNA plasmidial serão avaliadas em termos de quebras de simples e dupla-fita por eletroforese em gel de agarose e por dosagens de 8-hidróxi-2'-desoxirriboguanosina (8-HOdGua) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para avaliar os graus de extensão de peroxidação nos lipossomos, quatro parâmetros foram selecionados: 1) a dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Tbars); 2) dienos conjugados por espectrofotometria visível/UV e também determinações quantitativas de (3) malondialdeído (MDA) e (4) hidroperóxidos lipídicos (LOOH) por HPLC. Este estudo propiciará uma maior compreensão da ação antioxidante da astaxantina em animais e humanos, um cetocarotenoide que já vem sendo comercializado como suplemento alimentar para o aumento da performance atlética, na prevenção de câncer de próstata e de mama e na profilaxia de infecções bacterianas estomacais.

### 134 Isolamento e caracterização de polipeptídeos hormonais em cana-de-açúcar

Daniel Scherer de Moura  
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq)  
Universidade de São Paulo (USP)  
Processo 2002/08661-1  
Vigência: 1/5/2003 a 31/7/2008