

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-morfolinossidnonimina (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

Os objetivos deste projeto são identificar e caracterizar polipeptídeos hormonais em plantas de cana-de-açúcar que funcionem como sinais intra e intercelulares associados à defesa e ao desenvolvimento vegetal. A sistemina, um polipeptídeo de 18 aminoácidos envolvido na transdução de sinais em resposta à injúria, foi identificada em várias solanáceas. No entanto, em fumo, a sistemina só foi encontrada com a utilização do ensaio de alcalinização. Este ensaio tem-se mostrado útil na identificação de novos polipeptídeos tais como o Ralf. Além das sisteminas e do Ralf, outros polipeptídeos (por exemplo, fitossulfoquinas, Enod40, Clavata3 e SCRs) foram identificados em plantas. Embora o projeto Sucest tenha revelado apenas a existência de homólogos ao Enod40, a presença de homólogos envolvidos na via de sinalização em resposta à injúria e a ubiquidade de alguns polipeptídeos (por exemplo, fitossulfoquinas e Ralf) sugerem a existência de polipeptídeos semelhantes em cana-de-açúcar. O número crescente de polipeptídeos e a diversidade dos processos fisiológicos em que eles estão envolvidos são provas da sua importância e das potenciais aplicações de tais descobertas no melhoramento vegetal. O plano de trabalho a ser adotado envolve o estabelecimento do ensaio de alcalinização, o isolamento de polipeptídeos e a caracterização funcional dos genes precursores dos polipeptídeos em cana-de-açúcar.

135

### Controle redox de expressão gênica: caracterização de redes regulatórias e seu envolvimento na diferenciação de células-tronco (*stem cells*)

Oswaldo Keith Okamoto

Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein  
Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein  
(Sibibae)

Processo 2002/01826-5

Vigência: 1/12/2002 a 30/11/2006

Neste projeto, pretende-se investigar os eventos moleculares associados à perpetuação e diferenciação de células-tronco (*stem cells*) em estudos de genômica funcional. Uma vez que essa diferenciação é modulada pelo estado redox celular, parte-se do princípio de que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) ativam vias de sinalização e/ou eventos transcricionais específicos, culminando na regulação da expressão de grupos de genes (*regulons*), os quais podem exercer importante função nesse processo celular. Assim, propomos a caracterização de padrões globais de expressão gênica em células indiferenciadas e diferenciadas, expostas a ERO e ERN, visando à identificação de genes cuja expressão é alterada nas distintas condições experimentais. Esse papel sinalizador das ERO/N será investigado por meio das oscilações que estas causam no transcriptoma de células-tronco, como as derivadas de cordão umbilical e tecido germinativo em-

brionário, utilizando cDNA *microarrays*. Propomos ainda uma análise dos promotores dos genes redox-regulados na busca de elementos cis associados a fatores de transcrição que, juntamente com seus genes-alvo, servirão de substrato para a elaboração de redes regulatórias transcricionais. Essa organização hierárquica auxiliará na compreensão dos sinais de ativação, elementos regulatórios e genes envolvidos na diferenciação de células-tronco.

136

### Desenho racional de inibidores contra DHODH (diidroorotato desidrogenase) e aplicações no tratamento da doença de Chagas e no combate à praga do amarelinho

Maria Cristina Nonato

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo (USP)

Processo 2001/14583-0

Vigência: 1/7/2002 a 31/8/2007

O presente projeto visa à determinação da estrutura cristalográfica e a modelagem de inibidores da enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) proveniente de dois diferentes organismos: *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH), parasita causador da doença de Chagas, e *Xylella fastidiosa* (XfDHODH), uma bactéria fitopatogênica responsável pela “Praga do amarelinho”. DHODH pertence a um dos mais antigos processos metabólicos, a via de síntese de novo de nucleotídeo de pirimidinas, fundamental não somente na síntese de DNA e RNA, mas também em glicólise e biossíntese de lipídeos de membrana. DHODH atua no quarto passo dessa via metabólica e é responsável pela conversão de diidroorotato em orotato. DHODH utiliza o mononucleotídeo flavina (FMN, C17H21N4O9P1) como cofator, para promover a oxidação de diidroorotato, enquanto FMN é reduzido. A enzima DHODH foi identificada como sendo o alvo farmacológico de uma série de compostos químicos e naturais, tais como isoxazol, triazina, ácido cinchonínico e derivados de quinona. Estes compostos interferem em reações descontroladas do sistema imune, auxiliam no combate de infecções parasitárias, como malária, e em terapias antivirais através da diminuição da concentração intracelular de nucleotídeos de pirimidinas. No presente momento, existe um grande interesse em investigar inibidores de DHODH como agentes terapêuticos no tratamento de doenças que envolvem grande proliferação celular e/ou parasitária. Neste contexto, o projeto propõe a modelagem racional de inibidores baseado na estrutura cristalográfica de dois novos membros das DHODHs: diidroorotato desidrogenase do parasita *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH) e da bactéria *Xylella fastidiosa* (XfDHODH). A presença da via de biossíntese de novo de pirimidinas em ambos os organismos foi recentemente identificada e a inibição da mesma pode ser uma importante arma no combate à pro-