



XIX
Workshop
de
Genética

12, 13 e 14 de abril de 2019
Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP
Botucatu, SP, Brasil



ANAIS DO XIX WORKSHOP DE GENÉTICA

Volume 5 | 2019

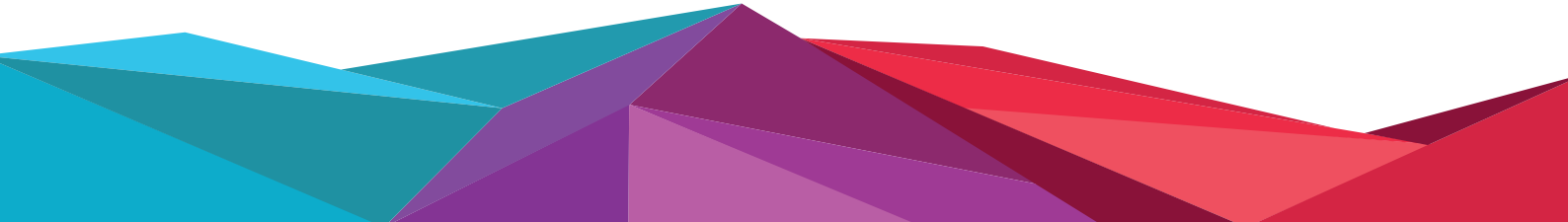
ISSN 2446-7367

APRESENTAÇÃO

O Workshop de Genética é um evento anual idealizado e organizado pelo corpo docente e discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), do Instituto de Biociências de Botucatu - IBB da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP. Tem como propósito criar um espaço para a discussão de temas atuais e dos grandes avanços na área de Genética.

CONTATO

Departamento de Genética
Instituto de Biociências de Botucatu
UNESP - Campus de Botucatu
Distrito de Rubião Júnior, S/N
CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil
E-mail: workshopgenetica@gmail.com



COMISSÃO ORGANIZADORA

DISCENTES

Me. André Luiz Molan
Barbara Mitsuyasu Barbosa
Beatriz Jacinto Alves Pereira
Bruno de Campos Souza
Me. Emiliana Weiss
Giovana da Silva Ribeiro
Me. Giordano Bruno Sanches Seco
Heitor Troca
Heloisa de Souza Andrade
Me. João Henrique Maria Assunção
Me. Jordana Inácio Nascimento
Me. Maiara Ribeiro Cornacini

DOCENTE

Prof. Dr. Danillo Pinhal

APOIO

Aisni Mayumi Corrêa de Lima Adachi
Diogo Pessuto Callegari
Emily Bronze
Dra. Fabilene Gomes Paim
Felipe Pereira
Letícia Lopes
Luís Ricardo Ribeiro da Silva
Luiz Miguel Alves de Oliveira
Marcus Alvarez
Natascha Nitzsche
Rafael Kunii
Me. Silvana de Melo
Victor Santos



COMISSÃO CIENTÍFICA

Dr. Adauto Cardoso
Dra. Adriane Pinto Wasko
Dra. Agnes Takeda
Dra. Amanda de Oliveira Ribeiro
Dr. André Batista Nobile
Dr. André Luiz Ventura Sávio
Dr. Bruno Tinoco Nunes
Dra. Camila do Nascimento Moreira
Dra. Camila Ferreira Bannwart Castro
Dr. Claudio de Oliveira
Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori
Dr. Diego Alonso
Dr. Douglas Silva Domingues
Dr. Duílio Mazzoni Zerbinato de Andrade Silva
Dr. Fábio Henrique Fernandes
Dr. Fabio Porto Foresti
Dr. Ivan de Godoy Maia
Dr. José Luiz Rybarczyk Filho
Dr. Josias Rodrigues
Dra. Juliana Rodrigues Lara
Dr. Leonardo da Cunha Menezes Souza
Dra. Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo
Dr. Luiz Augusto Bovolenta
Dra. Nadayca Thayane Bonani Mateussi
Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla
Dr. Samir Kadri
Dr. Sérgio Alexandre Alcântara dos Santos
Dra. Vanessa Paes da Cruz

EDITORAÇÃO CIENTÍFICA

Barbara Mitsuyasu Barbosa
Beatriz Jacinto Alves Pereira
Me. Emiliana Weiss
Dra. Fabilene Gomes Paim
Heloísa de Souza Andrade

08 a 11 de abril de 2019 - Atividade pré-evento

08:00 – 17:00 Curso teórico prático CRISPR-Cas9 – Prof. Dr. Miguel A. Moreno-Mateos (Andalusian Center of Development Biology - CABD, Espanha)

12 de abril de 2019 - Sexta-feira

12:00 – 14:00 Entrega do Material

14:00 – 16:00 Atividade pré-evento – *Open Lab*

16:00 – 17:30 Atividade pré-evento – Feira de Patrocinadores

17:30 – 18:00 Sessão de abertura

18:00 – 19:00 Palestra de abertura 1 “*CRISPRing zebrafish to understand early vertebrate development and human diseases*” – Prof. Dr. Miguel A. Moreno-Mateos (Andalusian Center of Development Biology - CABD, Espanha)

19:00 – 20:00 Palestra de abertura 2 “*Apis mellifera, um organismo modelo para estudos de genômica funcional de life histories*” – Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder (Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil)

20:00 – 20:30 Palestra técnica I

20:30 – 22:00 Mini-coquetel de boas-vindas

13 de abril de 2019 - Sábado

08:00 – 10:00 Minicursos/Feira de empreendedorismo*

**espaço para as empresas e projetos de empreendedorismo se apresentarem*

10:00 – 10:30 *Coffee break*

10:30 – 12:30 Minicursos/Divulgação científica em foco**

***espaço para projetos ligados a divulgação científica exporem seus trabalhos*

12:30 – 14:00 Almoço

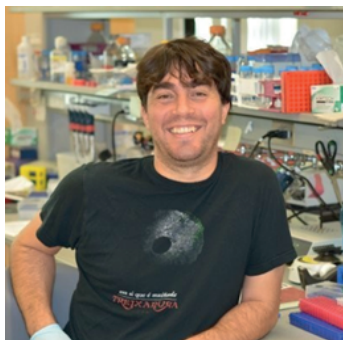
14:00 – 14:50 Palestra “Genômica e medicina personalizada” – Dra. Lia Kubelka Back (Biogenetika - Florianópolis, SC, Brasil)



- 14:50 – 15:35** Apresentação oral dos trabalhos selecionados – Categoria: Graduação
- 15:35 – 16:20** Apresentação oral dos trabalhos selecionados – Categoria: Pós-graduação
- 16:20 – 16:55** *Coffee break*
- 16:55 – 17:25** Palestra técnica II
- 17:25 – 19:25** Mesa redonda “Genética, genômica, meio ambiente e o futuro da biodiversidade”
- Palestra “Mudanças climáticas e peixes da Amazônia” – Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus, AM, Brasil)
- Palestra “Resposta do genoma vegetal às variações ambientais” – Profa. Dra. Ana Paula de Moraes (Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, SP, Brasil)
- Palestra “Do rascunho à versão final: como estamos montando genomas completos para o estudo da evolução e conservação da biodiversidade” – Dra. Marcela Uliano da Silva (*Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research*, Berlim, Alemanha)
- 19:25 – 20:55** Sessão de Apresentação de pôsteres/*coffee break*
- 21:00** Confraternização

14 de abril de 2019 - Domingo

- 08:30 – 09:20** Palestra “Microevolução Humana: história populacional de *Homo sapiens* vista através de fósseis, genes e artefatos” – Prof. Dr. Danilo Vicensotto Bernardo (Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brasil)
- 09:20 – 10:10** Palestra “Contribuição do Sequenciamento massivo/MPS nas análises de DNA forense” – Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Araraquara, SP, Brasil)
- 10:10 – 11:00** *Coffee break*
- 11:00 – 11:30** Palestra técnica III
- 11:30 – 12:30** Palestra de encerramento “Reparo de DNA e suas principais consequências para a célula: morte e mutagênese” – Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck (Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brasil)
- 12:30** Premiações e Encerramento



Palestra de abertura 1 – 12/04 (18h – 19h)

Título: CRISPRing zebrafish to understand early vertebrate development and human diseases

Palestrante: Prof. Dr. Miguel A. Moreno-Mateos

(Andalusian Center of Development Biology - CABD, Espanha)

CRISPR-Cas9 system is a powerful genome engineering approach that is now widely used. This targeting system is based on two components: a single guide RNA (sgRNA) that directs the Cas9 endonuclease to the target site to be mutated. However, variable activity across different sgRNAs can limit the mutagenic efficiency. We have optimized the CRISPR-Cas9 system in zebrafish by analyzing the mutagenic activity of 1920 sgRNAs and developing an algorithm, CRISPRscan (www.crisprscan.org) that efficiently predicts sgRNA activity *in vivo*. This and other optimizations have allowed us to perform functional genetic screens in vertebrates in a rapid and efficient manner identifying a novel protein complex involved in splicing and vertebrate brain development that is found mutated in patients with neurodevelopmental disorders. Together, these results provide novel insights into the determinants that mediate CRISPR-Cas9 efficiency and its application to uncover genes involved in human diseases and developmental disorders. However, the number of genomic targets of the CRISPR-Cas9 system is limited due to the PAM sequence restriction. To extend the *in vivo* repertoire of potential targeting sites in the genome, we have characterized and optimized different CRISPR associated endonucleases such as AsCpf1 and LbCpf1. We have demonstrated that i) LbCpf1, but not AsCpf1, ribonucleoprotein complexes allow efficient mutagenesis in zebrafish and *Xenopus* and ii) temperature modulates Cpf1 activity being this effect stronger on AsCpf1 which provides post-translational modulation of AsCpf1-mediated genome editing and explains its lower activity in ectothermic organisms such as *Drosophila*, *Xenopus* and zebrafish. All together, these results contribute to the molecular understanding of Cpf1 activity *in vivo* and establish this tool as an efficient and inducible genome engineering system across ectothermic species. Finally, one of the main interests in the early development field is to study the maternal-to-zygotic transition (MZT), a universal process that occurs in all animals. One of the critical stages during this transition is the activation of the silent zygotic genome after fertilization. However, the mechanisms underlying this process are poorly understood. To address this, we have optimized a CRISPR-Cas9-based live imaging approach of transcription in zebrafish and show that genome activation begins at the miR-430 locus. In contrast to current models, we show that genome activation does not require the titration of maternal repressors, occurs independent of cell division and is regulated through both translation of maternal mRNAs and the effects of these factors on the chromatin acetylation. In summary, these results open a new dimension into understanding the maternal factors and mechanisms that enable activation of the genome.

Palestra de abertura 2 – 12/04 (19h – 20h)

Título: *Apis mellifera*, um organismo modelo para estudos de genômica funcional de *life histories*

**Palestrante: Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder
(Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil)**



Insetos sociais (cupins, abelhas, formigas e vespas) compõem cerca de 30% da biomassa animal em quase todos os ecossistemas terrestres. Além dessa relevância ecológica, também possuem uma enorme importância econômica, tanto benéficas, como polinizadores e predadores de pragas, quanto como pragas em construções e sistemas agrícolas. O segredo por trás desse sucesso é a organização social com divisão de trabalho baseada em castas, com rainhas altamente férteis e operárias subférteis ou estéreis. Na maioria dos casos, o fator que determina a casta não é a genética do indivíduo mas a alimentação que uma larva recebe, como por exemplo a geleia real no caso das rainhas das abelhas melíferas. Na espécie *Apis mellifera* temos assim um organismo modelo para desvendar processos e mecanismos da Biologia de Desenvolvimento que geram plasticidade fenotípica por meio de hormônios e vias evolutivamente conservadas do sensoriamento de nutrientes. O resultado é a expressão gênica diferencial, especialmente no desenvolvimento do sistema reprodutor das castas rainha e operária. Um aspecto particularmente interessante nesse contexto é que as castas dos insetos sociais, a partir dessa plasticidade fenotípica, apresentam também uma quebra muito marcante no chamado *trade-off* entre reprodução e longevidade, que é um paradigma da teoria de *life histories* em animais.



Palestra – 13/04 (14h – 14h50)

Título: Genômica e medicina personalizada

**Palestrante: Dra. Lia Kubelka Back
(Biogenetika - Florianópolis, SC, Brasil)**

Mesa redonda – 13/04 (17h10 – 19h10)**Título: Genética, genômica, meio ambiente e o futuro da biodiversidade****Mesa redonda – Palestra 1****Título: Mudanças climáticas e peixes da Amazônia****Palestrante: Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val****(Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, Manaus, AM, Brasil)**

Considerados importantes potencializadores de mudanças em ambientes aquáticos, o aquecimento global, as modificações hidrológicas e a eutrofização vêm aumentando em frequência e número ao redor do planeta. Aliado a esses desafios, o aumento do dióxido de carbono (CO₂) atmosférico na ordem de 400ppm também vem gerando alterações no sistema climático da Terra, modificando sua dinâmica e seus padrões e tornando determinadas regiões do planeta mais quentes e mais secas. Para a região amazônica não seria diferente. Localizada na zona climática tropical, onde as principais forças direcionadoras são a temperatura e a umidade, essa região apresenta alta diversidade de espécies, incluindo um grande número de espécie endêmicas. Conseqüentemente, mudanças climáticas globais certamente afetariam a vida aquática e terrestre do maior repositório da biodiversidade global, o que já pode ser demonstrado por meio de vários dados naturais e experimentais. Dadas as previsões em cenários climáticos, como as espécies de peixes enfrentarão a magnitude de mudanças severas nos seus ambientes amazônicos? Para responder a esta pergunta, temos trabalhado, nos últimos anos, com a exposição de peixes amazônicos em ambientes controlados que simulam três cenários de mudanças climáticas previstos pelos relatórios do IPCC para o ano de 2100: B1 (leve), A1B (moderado) e A2 (extremo). Notadamente, nossos achados revelam que diferentes espécies de peixes apresentam diferentes estratégias e adaptações ao aumento de temperatura e CO₂, estratégias essas fisiológicas, bioquímicas, comportamentais, dentre tantas outras. Muitas destas diferenças estão relacionadas aos vários estilos de vida que cada população possui em um ambiente diverso como o ambiente aquático amazônico. Sob o ponto de vista genético, análises iniciais apontam certa plasticidade fenotípica, detectável por meio da capacidade das espécies em regular genes importantes para a sobrevivência nestas condições futuras. O uso de ferramentas avançadas para o estudo de organelas, histologia e moleculares, podem ajudar a elucidar cada vez mais como peixes economicamente importantes para a região amazônica enfrentam tais desafios. A expressão gênica diferenciada de genes-alvo pode ajudar no esclarecimento das estratégias metabólicas que cada espécie possui para sobreviver. Já, análises mais complexas como transcriptomas diferenciais, quantificam mudanças na expressão de cada transcrito em diferentes condições avaliadas, as quais podem estar relacionadas a outros parâmetros fisiológicos em resposta às mudanças naturais. Por exemplo, duas espécies congêneres de tetras expressam diferencialmente genes relacionados ao metabolismo

anaeróbico - LDH (lactato desidrogenase) e, portanto, sua sobrevivência é afetada face a essas condições. É importante não generalizar como cada espécie enfrenta desafios ambientais. Outros mecanismos genéticos podem ser responsáveis por tal plasticidade. Mecanismos epigenéticos, por exemplo, podem alterar a estrutura do DNA ou regular a expressão gênica pós-transcrição. Assim, os padrões de expressão de um gene-alvo são modificados, o que reflete na capacidade de sobrevivência dos organismos, além de propiciar respostas rápidas frente ao estressor imposto. Imaginar que genes comandam toda a maquinaria metabólica para lidar com os impactos das mudanças climáticas é atualmente possível a partir de todo arcabouço molecular disponível nas mais diversas plataformas. Ainda, é necessário ampliar o conhecimento quanto à capacidade adaptativa das espécies amazônicas bem como o impacto negativo sob o aspecto biológico e econômico da biota aquática frente às mudanças climáticas.



Mesa redonda – Palestra 2

Título: Resposta do genoma vegetal às variações ambientais

Palestrante: Profa. Dra. Ana Paula de Moraes

(Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, SP, Brasil)

A distribuição das espécies é determinada por limitantes fisiológicos (e.g., requerimentos abióticos), relações mutualísticas e capacidade de dispersão. Entretanto, os limitantes econômicos, como tamanho de genoma (do inglês, *genome size* - GS) e cariótipo (e.g., o número cromossômico) têm sido pouco explorados. Assim, abordagens integradas que levem em consideração a história evolutiva do clado e as características ecológicas das espécies minimizariam esse gap do conhecimento. Visando compreender como diferentes fatores interagem e como influenciam a distribuição geográfica das espécies, aqui nós focamos em um grupo de orquídeas, a subtribo *Maxillariinae*, que apresenta ampla distribuição do Brasil, mas chegando também a alguns países da América do Sul. As orquídeas desse grupo apresentam ampla diversidade morfológica, grande variação de GS e número cromossômico, além de uma hipótese filogenética bastante robusta. Unindo todos esses dados e utilizando envelopes climáticos, foi possível detectar que a distribuição predita das espécies da subtribo *Maxillariinae* é desde o sul da Califórnia até o norte da Argentina e sul do Brasil, se estendendo, com poucos pontos de predição, até a costa do Uruguai. Dentre as 20 variáveis bioclimáticas testadas (19 variáveis bioclimáticas obtidas do banco de dados Chelsea, além da altitude), seis parecem contribuir de forma decisiva para a distribuição das espécies de *Maxillariinae* [média do período de luz diário, temperatura média do quartil mais frio, sazonalidade, isothermalidade (i.e., variação diária da temperatura em relação à variação anual), precipitação média no quartil mais quente e ecorregião). A variação de número cromossômico na subtribo *Maxillariinae* é consequência de recorrente disploidia, com eventos de poliploidia concentrado em alguns poucos gêneros, sempre compondo citotipos. Entretanto, mesmo em baixa frequência, os

poliploides parecem exercer forte influência no número de habitats alternativos que a espécie ocorre, especialmente na ocorrência como exclusivamente epífita (aumento do número cromossômico foi negativamente correlacionado com o número de habitat diferentes e com hábito exclusivamente epifítico). Resultado semelhante foi observado quanto à variação de GS - espécies que apresentam hábito exclusivamente epifítico apresentaram tamanho de GS menor em comparação às espécies não-exclusivamente epifíticas. Removendo-se os poliploides da amostra, não há correlação entre variações genômicas e variáveis abióticas. Contudo, se considerarmos a amplitude de variação das variáveis abióticas (e não o valor médio), tanto o número cromossômico quanto o GS mostram correlação com algumas variáveis, mesmo removendo-se os poliploides da amostra. Por exemplo, é possível observar que o aumento do GS parece ser negativamente correlacionada com isothermalidade. Considerando que a subtribo *Maxillariinae* é originária da região amazônica, local com alta isothermalidade, a colonização da Mata Atlântica e outras regiões subtropicais ocorreu provavelmente junto do aumento do GS. Essa tendência pode ser observada em *Bifrenaria*, gênero em que foi possível detectar aumento do GS com o movimento para a Mata Atlântica - sem mudança do número cromossômico. Um segundo aumento do GS ocorreu concomitante à troca de habitat - de epifítico para rupícola - na poliploide *B. tyrianthina*. O aumento do GS é tradicionalmente associado à distribuição geográfica restrita, o que pode ser detectado em dois gêneros sem variação do número cromossômico: *Brasiliorchis* and *Scuticaria*. Nos dois gêneros, as espécies com aumento do GS apresentam distribuição microendêmica. Considerando os dados obtidos podemos concluir que a variável número cromossômico e, principalmente, GS influenciam a ecologia das plantas e a distribuição geográfica é um produto da interação entre GS e características abióticas como flutuação da temperatura e umidade.



Mesa redonda – Palestra 3

Título: Do rascunho à versão final: como estamos montando genomas completos para o estudo da evolução e conservação da biodiversidade

Palestrante: Dra. Marcela Uliano da Silva

(Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlim, Alemanha)

Certos historiadores da ciência dirão que a revolução científica do século XXI está na Biologia. Desde o sequenciamento da primeira versão do genoma humano em 2002, o barateamento e os avanços nos métodos de sequenciamento e bioinformática nos permitiram sequenciar as primeiras versões rascunho (*draft*) de genomas de centenas de espécies não-modelo, para além do genoma humano. Esses genomas *draft* foram a base para imensos progressos no entendimento dos mecanismos moleculares da evolução. No entanto, a natureza incompleta desses genomas *draft* deixou algumas lacunas no conhecimento – principalmente no que diz respeito a influência das áreas repetitivas do genoma nos mecanismos moleculares das espécies. Nesta palestra irei apresentar como nós, os pesquisadores do Vertebrates Genome Project do consórcio internacional Genome 10K (VGP/G10K), estamos fazendo para montar

genomas Platinum (em nível cromossômico, onde os dois haplótipos estão representados e praticamente livre de erros) para todos os vertebrados. Mais especificamente, irei apresentar como o uso das últimas tecnologias de sequenciamento (PacBio, Chromium 10X, Bionano e HiC) e de uma nova pipeline de montagem estão levando o genoma da preguiça de dois dedos, *Choloepus didactylus*, ao nível Platinum, e como esse genoma é a primeira referência para o estudo das peculiaridades evolutivas dos *Xenarthra*: um dos mais antigos grupos de mamíferos placentários que evoluiu exclusivamente na América do Sul.



Palestra – 14/04 (08h30 – 09h20)

Título: Microevolução Humana: história populacional de *Homo sapiens* vista através de fósseis, genes e artefatos

Palestrante: Prof. Dr. Danilo Vicensotto Bernardo

(Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brasil)

Processos microevolutivos são, por definição, aqueles que resultam em novidades evolutivas, como as mudanças de frequências gênicas por exemplo, ocorridas em escala populacional intraespecífica. Nas investigações da história evolutiva humana, os estudos microevolutivos debruçam-se sobre os processos de diferenciação e diversificação ocorridas ao longo dos eventos de surgimento e dispersão de *Homo sapiens* e as possíveis relações com outros hominínios tardios. Nesta apresentação, iremos explorar aspectos paleoantropológicos, morfológicos, genéticos e comportamentais ocorridos ao longo dos últimos 300.000 anos, período que marca o surgimento do *Homo sapiens* no planeta.

Palestra – 14/04 (09h20 – 10h10)

Título: Contribuição do Sequenciamento massivo/MPS nas análises de DNA forense

Palestrante: Profa. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Araraquara, SP, Brasil)



Palestra de encerramento – 14/04 (11h30 – 12h30)

Título: Reparo de DNA e suas principais consequências para a célula: morte e mutagênese

**Palestrante: Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck
(Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brasil)**



O genoma de todos organismos está sujeito a ataques de agentes físicos ou químicos que estão constantemente promovendo lesões na molécula de DNA. Esses agentes podem ser externos, como luz solar, poluição, fumaça de cigarro, fármacos antitumorais, etc, como internos, subprodutos naturais do metabolismo celular, como radicais de oxigênio. Esses danos no DNA podem resultar em bloqueios da transcrição ou mesmo da replicação dessa molécula. Para minimizar os efeitos desses danos, a célula conta com mecanismos de defesa que incluem processos de remoção ou tolerância às lesões. Ainda assim, danos não reparados podem ter consequências importantes para as células, sendo as principais a morte celular ou mutagênese. No organismo humano essas consequências podem resultar em processos de envelhecimento ou carcinogênese. Estes efeitos são dramaticamente ilustrados em pacientes com síndromes humanas com deficiências em processos de reparo de DNA, com sintomas clínicos que incluem alta frequência de tumor e/ou problemas no desenvolvimento e envelhecimento precoce. Entre essas síndromes destacamos *xeroderma pigmentosum* (XP), com altos níveis de lesões, inclusive tumores, na pele exposta a luz solar. Cerca de 20 a 30% desses pacientes XP também apresentam sintomas de problemas neurológicos e envelhecimento precoce. Temos usado células de pacientes XP como modelo para entender melhor como nossos sistemas de reparo nos defendem das lesões no DNA, buscando entender como essas podem resultar em tumorigênese e mesmo envelhecimento precoce.

DESCRIÇÃO DA ATIVIDADE*

Os laboratórios vinculados ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) estarão de portas abertas aos participantes do XIX Workshop de Genética. A apresentação dos laboratórios será conduzida por professores ligados a Pós-graduação em Genética do IBB. Um bate-papo sobre a linha de pesquisa desenvolvida no laboratório e um pouco mais sobre a vida de Pós-graduação.

**Essa atividade requer inscrição prévia, juntamente com o formulário de inscrição, escolhendo apenas um laboratório para visitação.*

Lab 01 – Laboratório de Biologia e Genética de Peixes **Prof. Dr. Claudio de Oliveira e Prof. Dr. Fausto Foresti**

As pesquisas realizadas pelo Laboratório de Biologia e Genética de Peixes têm sido centralizadas no estudo da fauna de peixes neotropicais, de água doce e marinha, com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a constitui o do grupo, diversidade, processos evolutivos envolvidos em sua origem e manuten o e na aplica o de conhecimentos básicos na piscicultura. As pesquisas têm sido conduzidas nas seguintes áreas: citogenética geral e molecular, evolu o cromossômica, estrutura e fun o cromossômica; organiza o genômica de famílias multigênicas e de elementos repetitivos de DNA não-codificadores, genética de popula es, conserva o genética de popula es naturais, análises genéticas de estoques cultivados, taxonomia, sistemática molecular e estudos em biodiversidade a nível molecular.

Lab 02 – Laboratório de Toxicogen mica e Nutrigenômica (OMICS) **Profa. Dra. Daisy Salvadori**

O Laboratório de Toxicogen mica e Nutrigenômica - OMICS atua nas Linhas de Pesquisa de Mutagênese e Carcinog nese. Especial ênfase   dada para 1) a identifica o de agentes físicos, químicos e biológicos que podem causar altera es na estrutura do DNA (genotoxicidade) e sobre os padrões de expressão gênica (toxicogenômica); 2) a identifica o de compostos naturais capazes de prevenir altera es genéticas induzidas por contaminantes ambientais (antimutag nese e anticarcinog nese); 3) a identifica o de marcadores de suscetibilidade genética para o desenvolvimento de doenças (epidemiologia molecular); 4) as intera es gene-dieta (nutrigenômica).

Lab 03 – Systems Biology and Genomics Lab
Prof. Dr. Guilherme Valente

O grupo SBGL (Systems Biology and Genomics Lab.) tem como missão estudos na área de Biologia de Sistemas (redes) e genômica. Atualmente, o foco principal do grupo é análises de tolerância ao etanol em leveduras com foco em redes biológicas e integração de dados. Nesse contexto, lidamos com dados OMICs (genômica, transcriptoma, proteômica e metabolômica) além de experimentos de fermentação, citometria de fluxo, análises de biologia celular, entre outros. No entanto, o grupo é mais especializado em bioinformática, lidando com análises de dados de Next Generation Sequencing e espectrometria de massas, modelagens e extração de padrões por meio de inteligência artificial, filogenias, genômica funcional, redes, entre outras. Também, somos desenvolvedores de softwares para diversas análises de bioinformática, tal como classificadores de rotas metabólicas de enzimas e genotipagem de HIV. Por fim, colaboramos com diversos grupos do Brasil e do exterior em diversas abordagens, tais como estudos de HIV e HCV, experimentos com lncRNAs de tomateiros, aspectos do transcriptoma durante fermentação, citogenômica, entropias, entre outros. Na sua visita, reportaremos as linhas de pesquisa que o grupo atua, as nossas estratégias de análises, as instalações de bioinformática e também resultados que estamos gerando.

Lab 04 – Laboratório de Microbioma e Genômica Bacteriana (LMGB)
Prof. Dr. Josias Rodrigues

Historicamente, as bactérias têm sido consideradas não apenas como organismos unicelulares, mas também completamente independentes, sem muita inter-relação entre si, com os vírus e com os Eucariotos. Também, se observa que a maioria das pessoas considera bactérias como organismos prejudiciais, geralmente causadores de doenças. Na verdade, ao longo do tempo, diferentes áreas da Ciência têm demonstrado que as bactérias em geral são interdependentes, interagem de modo significativo com o meio onde se encontram, determinando diversas situações no tempo e no espaço, vindo a constituir um Ecossistema. Os Ecossistemas microbianos, referidos como Microbiomas, são essenciais para diferentes tipos de atividade biológica. O microbioma humano, que é composto em sua maioria (>90%) por bactérias é essencial para a manutenção da homeostase do organismo, de modo que distúrbios que impliquem em desequilíbrio na composição de espécies (disbiose) podem resultar em diversos tipos de patologia como a obesidade e as doenças inflamatórias intestinais (DII). Estas últimas foram doenças cuja participação do microbioma foi mais intensivamente investigada e se insere na linha de pesquisa do Laboratório de Microbioma e Genômica Bacteriana (LMGB) do Instituto de Biociências da UNESP. Diversos trabalhos no desenvolvidos no exterior e no Brasil têm demonstrado que portadores de DII apresentam uma intensa disbiose. Além da caracterização da disbiose do microbioma intestinal destes pacientes, estudos desenvolvidos no LMGB em colaboração com pesquisadores de outros

Centros de Pesquisa da UNESP de Botucatu pretendem restaurar a composição de espécies microbianas do intestino destes pacientes através da dieta ou de eventos de transplantação fecal.

Lab 05 – Laboratório Genômica Integrativa
Prof. Dr. Cesar Martins

O Laboratório Genômica Integrativa visa explorar polimorfismos cromossômicos naturalmente estabelecidos (associados a cromossomos B e cromossomos sexuais) como modelos para investigar a natureza estrutural e funcional das modificações cromossômicas e genômicas ocorridas durante o processo evolutivo. O comportamento dos cromossomos durante o ciclo celular está sujeito a rearranjos genômicos produzindo uma ampla variedade de consequências funcionais com impacto em desordens celulares e também gerando novidades evolutivas. Sob a luz da geração massiva de dados biológicos envolvendo DNA, RNA, proteínas e epigenética, e redes de interação, focamos na identificação da origem e papel das mudanças cromossômicas para compreender suas consequências funcionais e evolutivas. Adicionalmente objetivamos ainda a divulgação científica de conhecimentos acerca dos cromossomos, sob a ótica evolutiva e funcional, como forma de aproximar o diálogo entre ciência e sociedade.

Lab 06 – Laboratório de Pesquisa em Análises Genéticas (PANGENE)
Prof. Dr. Paulo Ribolla

O laboratório PANGENE desenvolve projetos relacionados ao estudo de doenças negligenciadas no Brasil. Trabalhamos em 03 diferentes frentes principais: 1. Estudo genético populacional de *Anopheles darlingi*: Através da genética populacional, estudamos a estrutura deste vetor em diferentes áreas da Amazônia, tentando entender como esta estruturação populacional afeta a transmissão da malária e procurando novas ferramentas de controle desta transmissão. 2. Relação ecológica entre *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*: Analisamos ao nível molecular (expressão gênica) os fatores relacionados com o processo de acasalamento e a interação destas duas espécies, numa tentativa de desenvolver novas ferramentas para o controle de *Aedes aegypti*. 3. Interação *Leishmania infantum* e macrófagos: Através da metodologia CRISPR/Cas estamos estudando a relação de diferentes genótipos humanos e a infecção pelo parasita, causador da leishmaniose visceral americana, *Leishmania infantum*.

Lab 07 – Laboratório de Epigenética
Profa. Dra. Claudia Aparecida Rainho

Mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica envolvem modificações herdadas, porém reversíveis, da cromatina e incluem a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas, os fatores remodeladores da cromatina, além dos RNAs não codificadores. Nas últimas décadas, muitos estudos demonstraram o papel das modificações epigenéticas em vários processos biológicos e estabeleceram que a perda dos perfis epigenéticos normais são fatores chave no desenvolvimento de doenças humanas complexas como os distúrbios autoimunes, neurológicos e o câncer. Câncer é uma doença heterogênea que se desenvolve em múltiplas etapas associadas ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Neste contexto, o Laboratório de Epigenética desenvolve estudos dos mecanismos epigenéticos envolvidos em doenças humanas, com enfoque na identificação de biomarcadores diagnósticos e prognósticos bem como o desenvolvimento de estratégias para a identificação de novos compostos químicos aplicados à quimioprevenção e terapia epigenética do câncer.

Lab 08 – Laboratório de Genética Molecular de Plantas
Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

Os transportadores mitocondriais estão envolvidos no intercâmbio de metabólitos e intermediários entre a mitocôndria e o citoplasma celular. Pela sua conhecida participação na manutenção da homeostase mitocondrial e, portanto, celular, bem como nos mecanismos de resposta das plantas aos estresses ambientais, esses transportadores se tornaram alvos importantes da pesquisa vegetal. Atualmente, o nosso grupo tem como foco de pesquisa os transportadores de dicarboxilato (DICs), cujo papel é ainda pouco estudado em plantas, e as proteínas mitocondriais desacopladoras (UCPs), sabidamente importantes na modulação do estado redox. Diferentes abordagens estão sendo utilizadas para investigar o papel e a relevância das diferentes isoformas destes transportadores presentes na planta modelo *Arabidopsis thaliana*, tanto no metabolismo mitocondrial como nos mecanismos de tolerância aos estresses. Espera-se demonstrar a importância fisiológica de cada proteína, fornecendo, assim, subsídios para o emprego futuro dos referidos genes/proteínas em estudos translacionais e aplicados, visando o aumento de tolerância aos estresses ambientais.

Lab 09 – Laboratório de Estudos em Biocomplexidade**Prof. Dr. Dr. José Luiz Rybarczyk Filho**

O Laboratório de Estudos em Biocomplexidade possui trabalhos em bioinformática e biologia de sistemas na integração de dados de Transcriptoma e redes biológicas (Big data e Complex data) para responder questões referentes a estudos de novas drogas, progressão de tumores, desenvolvimento de ferramentas computacionais.

Lab 11 – Laboratório de Genética Molecular de Plantas**Prof. Dr. Celso Luis Marino**

Atualmente são desenvolvidas no CAGEN (Centro de análises genômicas) pesquisas moleculares e genômicas para auxiliar programas de melhoramento em *Eucalyptus* e conservação genética de espécies nativas, assim como no estudo de doenças que acometem essas espécies. Por meio de sequenciamento de nova geração (NGS) são desenvolvidos e disponibilizado pelo grupo marcadores moleculares. Esses são utilizados para auxílio na investigação de regiões de interesse nos programas de melhoramento, estudo de sistema de reprodução e fluxo gênico de espécies arbóreas, além de identificação de fungos e bactérias fitopatológicas. Portanto, o grupo atua de forma relevante na pesquisa do setor florestal em parceria com empresas e na disponibilização de resultados para tomadas de decisões e estratégias na conservação da flora brasileira.

Lab 12 – Laboratório de Serviço de Aconselhamento Genético**Profa. Dra. Lucilene Arilho Ribeiro-Bicudo**

Minicurso 1 – Utilização de dados cromossômicos em filogenia**Ministrante: Dra. Camila do Nascimento Moreira****Ementa:**

- Bases da citogenética clássica e molecular;
- Fundamentos da filogenética e cladística;
- Aplicação das análises filogenéticas em dados cromossômicos;
- Montagem da matriz de dados cromossômicos;
- Escolha dos métodos de análise;
- Interpretação dos dados.

Minicurso 2 – Telômeros: longevidade e envelhecimento**Ministrantes: Dra. Edna Gicela Ortiz Morea, Me. Whisnayer Martins Gentil**

Ementa: Os telômeros são estruturas nucleoprotéicas, envolvidos em diversos processos importantes como: controle da divisão celular, envelhecimento, regulação da transcrição, integridade do genoma e manutenção da arquitetura nuclear. O foco do minicurso é entender como o mecanismo molecular da biologia telomérica está envolvida no envelhecimento, e como este mecanismo pode ajudar no desenvolvimento de diagnósticos e tratamentos de algumas doenças.

Minicurso 3 – Biotecnologia e conservação genética de plantas**Ministrantes: Me. Rômulo Pedro Macêdo Lima, Dr. Ricardo de Oliveira Manoel**

Ementa: Este minicurso teórico-prático tem como objetivo apresentar os princípios básicos para estudos de conservação genética de plantas. Para tanto, serão abordadas metodologias biotecnológicas para fenotipagem em plantas e de genética molecular, como a extração de DNA que será realizada em aula prática de laboratório.

Minicurso 4 – Aplicação de marcadores SNPs em análises genéticas de plantas**Ministrantes: Me. Mariane Silva Felicio, Me. Caroline Ariyoshi, Me. Paula Oliveira Camargo**

Ementa: O curso abordará a aplicação de marcadores moleculares tipo SNP no estudo de diversidade genética em populações de plantas através de ferramentas de bioinformática. A parte teórica do curso será fundamentada nos seguintes conteúdos: marcadores SNPs, estrutura genética de populações e aplicação no melhoramento de plantas. A parte prática consistirá na análise de dados reais com o auxílio do software online SNIPlay.

Minicurso 5 – Conceitos básicos e aplicações no Aconselhamento Genético

**Ministrantes: Camila Cristina de Oliveira Alves, Me. Priscila Medeiros, Me. Stéfany Lopes
Lucas Empke**

Ementa: Introduzir os princípios básicos do Aconselhamento Genético, abordando as principais etapas desde a consulta ao diagnóstico. Abordar os principais fenótipos clínicos que auxiliam na hipótese diagnóstica e como as diferentes técnicas laboratoriais contribuem para desfecho clínico. Realizar atividade teórico-prático que instigue os alunos a aplicar os conceitos abordados durante o minicurso.



RESUMO

ENSINO MÉDIO

DEVELOPMENT OF A PEDAGOGICAL MATERIAL FOR GENETICS TEACHING IN PUBLIC HIGH SCHOOLS

Guimarães, Gabriela M.¹; Reis, Laura B.¹; Silva, Luana K. J.¹; Barros, Maria E. F.¹; Pereira, Maurício J. B.¹; Inácio, Thais¹; Fernandes, Barbara C. S.¹; Jammal Filho, Fawaz A.¹; Mota, Ligia S. L.²; Wasko, Adriane P.²

¹Colégio Embraer “Casimiro Montenegro Filho”

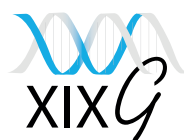
²Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

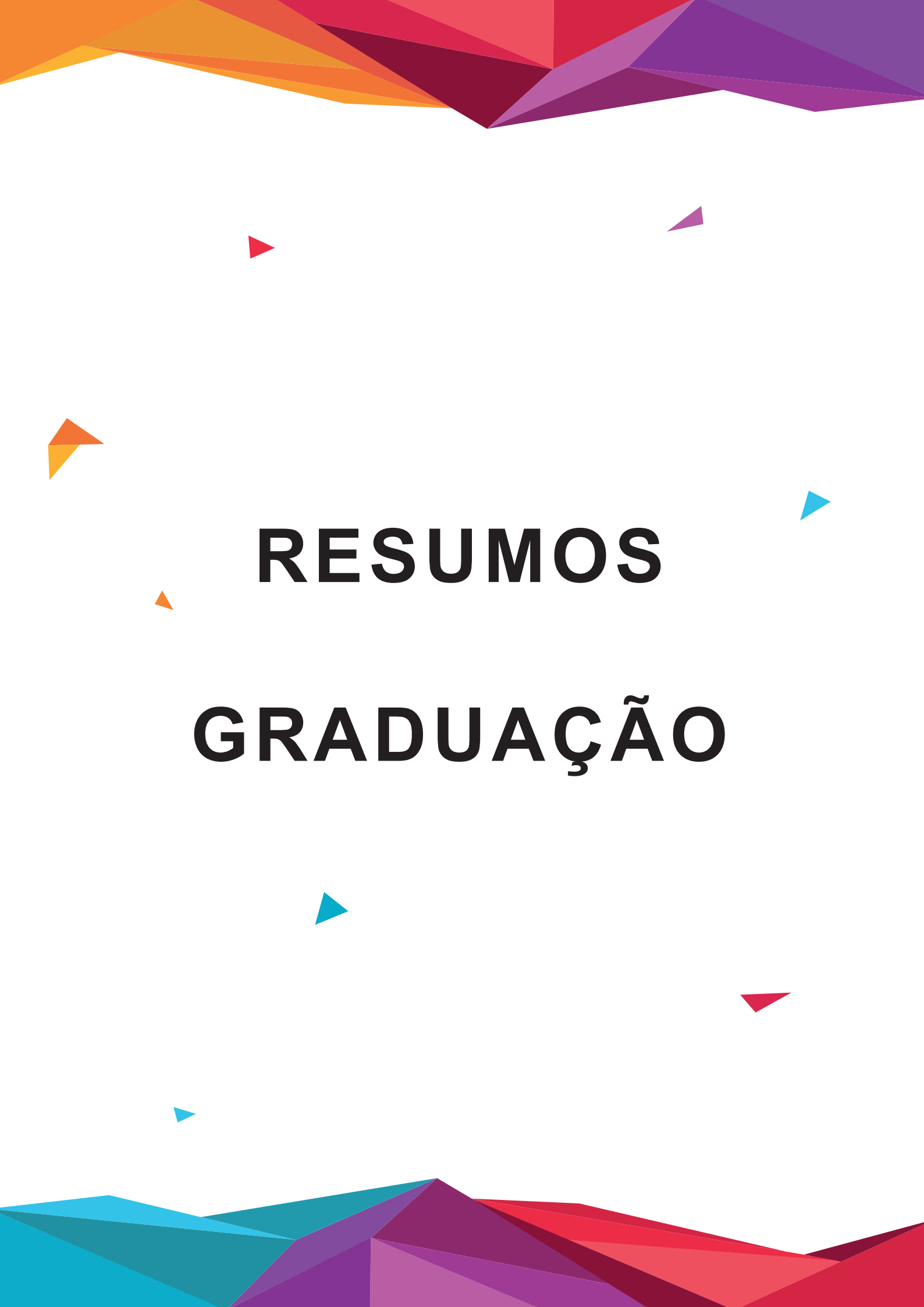
e-mail: fawaz.filho@redepitagoras.com.br

Genetics is an essential science nowadays and, for this reason, it's a matter of notorious importance teaching it appropriately to achieve the best levels of comprehension. However, the current situation in Brazilian's education is something extremely precarious, especially in public institutions. The most worrying factor is when undergraduates start college, with a huge lack of knowledge in certain curricular components. In the Biological Sciences area, due the complexity of the subject, there is a great understanding problem in Genetics topics by the students. The objective of this study was to elaborate a new educational and interactive material which does not require many resources in order to teach Genetics, especially cytogenetics and several chromosomal alterations, to high school students from public and private schools. The prototyping of a pedagogical material to teach Genetics was developed by students from Colégio Embraer “Casimiro Montenegro Filho” in partnership with the Institute of Biosciences of Unesp, Botucatu Campus: forty seven magnetized plastic pieces which represent chromosomes that constitute the human karyotype (female or male); more five extra pieces representing numerical changes (as Down, Edwards, Patau, Turner and Klinefelter syndromes); two larger pieces with seventeen parts each representing structural alterations in the chromosomes (as deletion, duplication, inversion, and translocation); one metal board for securing parts; one explanatory guide; and one case for transportation and storage of the product. Due to the complexity of the subject, we conclude that the proposed material seems to be a good choice to make Genetics learning for high school students more interactive, interesting, dynamic, and easy to understand. A pilot class was held with professors of Biology and 3rd grade students from the Embraer College, in which the interactive material was applied so that it could be evaluated and possible doubts and suggestions could be raised in order to improve it. However, it is still necessary to use the interactive material in test lessons to verify the effectiveness of the learning process and/or to improve it. It should be emphasized that there are no similar educational materials in the national or international market and that the next steps in this work refer to the production of an educational kit in partnership with a Brazilian company and subsequent referral of the INPI (National Institute of Industrial Property) letter to obtaining a patent.

Keywords: Genetics, pedagogical material, chromosomal alterations.

Financial support: FAPESP – 2015/16661-1.





RESUMOS
GRADUAÇÃO

OBTATION OF THE *Leishmania major* TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE DOMAIN RECOVERED FROM BACTERIAL INCLUSION BODIES

Silva, Vitor S.¹, Viviescas, Maria A.¹, Fernandes, Carlos A.², Fontes, M. R.², and Cano, Maria Isabel N.¹

Genetics Dept.¹ and Physics and Byophysics Dept.² Biosciences Institute of Botucatu, São Paulo State University - UNESP, - SP.

Viiitor.l@hotmail.com

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by parasites of the family Trypanosomatidae, genus *Leishmania*. Currently, there are no effective treatment and control against the disease, and to seek for new therapeutic targets is highly encouraged. Studies about telomeres have been considered of great relevance due to its importance in the maintenance of genome stability and the parasite cellular proliferation. Telomeres are maintained by the action of a ribonucleoprotein, named telomerase, composed of the protein TERT (telomerase reverse transcriptase) and an lncRNA (TER, Telomerase RNA). TERT is a large protein bearing 4 structural and functional domains TEN, TRBD, RT and CTE. The RT (Reverse Transcriptase) domain, for example, is conserved among all described TERTs and contains the catalytic core of the enzyme. This work aims to obtain the recombinant *L. major* TERT RT domain using a bacterial expression system and to obtain an efficient protocol for its purification in order to perform *in vitro* protein-interaction assays. To obtain the recombinant protein the RT domain was cloned into a bacterial expression vector (pET28A (+)) and subsequently was used to transform different bacterial strains in order to find the best conditions to express the protein and to perform solubility tests. The results of these tests revealed that the protein is being expressed in large amount in the insoluble fraction of the protein extract, suggesting that the RT domain is an inclusion body recombinant protein. Further, we sought to recover the protein from the inclusion bodies using several steps such as isolation of inclusion bodies by centrifugation, washing in the presence of urea and high salt to remove contaminants and solubilization of aggregated protein in the presence of 8M urea and beta-mercaptoethanol. The results showed to be very promising due to the significant reduction of contaminants that were presented in the crude extract. In order to refold the solubilized protein, we used stepping dialysis against buffers containing decreasing amount of urea and salt. We further checked the protein folding state using fluorescence spectroscopy, which indicated that the recombinant RT domain was properly folded. To confirm the above result, we intend to perform circular dichroism spectroscopy analysis. Purified recombinant RT domain will be used in protein - protein and protein - nucleic acid interaction assays, in order to unveil its functions in telomerase activity and assembly.

Keywords: *Leishmania*, leishmaniasis, RT domain, inclusion bodies and telomerase.

Supporting: CNPq and FAPESP.

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE RAIAS DO GÊNERO *Hypanus* (Chondrichthyes: Dasyatidae) NA COSTA DO BRASIL

Boza, Beatriz R¹; Cruz, Vanessa P¹; Dorini, Tathiana S¹; Adachi, Aisni M C L¹; Ariza, Ailton A¹; Marцениuk, Alexandre P¹; Rotundo, Matheus M²; Vianna, Marcelo³; Foresti, Fausto¹; Oliveira, Claudio¹;

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/IBB, Botucatu, SP, Brasil

² Universidade Santa Cecília – UNISANTA, Santos, Sp, Brasil

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

beatriz.boza@unesp.br

Existem espécies que apresentam grande similaridade morfológica, o que torna sua identificação complexa, podendo ocorrer erros taxonômicos. Esse é o caso do grupo de raias do gênero *Hypanus*, que apresenta entre si, grande semelhança morfológica entre suas espécies. Técnicas moleculares têm sido utilizadas para auxiliar na identificação dessas espécies, e, dentre essas técnicas, destaca-se o DNA *Barcoding*, que consiste em utilizar uma região do gene COI (Citocromo Oxidase Subunidade I) do DNA mitocondrial para comparar indivíduos e espécies. O DNA *barcoding* fornece inúmeras informações sobre limites de espécies, comunidades ecológicas, evolução de traços funcionais, interações tróficas, informações para auxiliar na identificação de espécies, possíveis riscos de extinção e conservação da biodiversidade. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo identificar molecularmente as espécies do gênero *Hypanus* coletadas na costa do Amapá (n=19), Ceará (n=1), Sergipe (n=1), Bahia (n=3), Rio de Janeiro (n=13), São Paulo (n=4) e Paraná (n=10) utilizando a ferramenta DNA *barcoding*. Dos animais coletados, foram retirados fragmentos de nadadeiras e posteriormente, realizada a extração do DNA total, amplificação e sequenciamento do gene COI. As análises das sequências foram realizadas no *software* Geneious 4.8.5, os dados estatísticos e a construção da árvore de *Neighbor-Joining* (NJ) baseado no modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) foram feitas no MegaX-64, tendo a confiabilidade dos ramos verificada pelo valor de *bootstrap* (>70). Entre os 54 indivíduos analisados, foram identificadas duas espécies do gênero *Hypanus*, sendo 50 indivíduos de *Hypanus guttatus*, sendo 19 do Amapá, 1 do Ceará, 1 de Sergipe, 3 da Bahia, 12 do Rio de Janeiro, 4 de São Paulo, 10 do Paraná e 4 indivíduos de *H. americanus* sendo todos do Rio de Janeiro. A distância genética interespecífica encontrada entre *H. guttatus* e *H. americanus* foi de 4,9%. Com esses resultados, podemos afirmar que a ferramenta DNA *barcoding* se mostra eficiente na identificação molecular de espécies.

Palavras-chave: DNA *barcoding*, *Batoidea*, DNA mitocondrial.

IDENTIFICAÇÃO E DELIMITAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DE TUBARÕES DO GÊNERO *Squalus* (Chondrichthyes; Squalidae) COM O USO DO DNA BARCODE

Adachi, Aisni MCL¹; Cruz, Vanessa P¹; Roque, Pollyana CG²; Dantas, Najila C¹; Giovana S. Ribeiro¹; Souza, Bruno C¹; Vianna, Marcelo²; Delpiani, Sergio M³; Hazin, Fabio V⁴; Claudio Oliveira¹; Fausto Foresti¹

¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/IBB, Botucatu, SP, Brasil

² Laboratório de Biologia e Tecnologia Pesqueira, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ Grupo de Biotaxonomía Morfológica y Molecular de Peces (BIMOPE), Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (IIMyC, CONICET-UNMdP), Funes, Mar del Plata, Argentina

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CABA AAJ, Buenos Aires, Argentina

O gênero *Squalus* constitui um grupo de tubarões com cerca de 26 espécies conhecidas, com distribuição circunglobal. A identificação taxonômica deste grupo é bastante problemática, principalmente devido à alta similaridade morfológica encontrada entre as espécies, sendo classificados na IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) como dados insuficientes. No sentido de colaborar com informações sobre este grupo de tubarões, o presente trabalho teve como objetivo utilizar a técnica de DNA-barcode (COI) para a identificação molecular, com análises de delimitação de espécies para verificar o número de unidades evolutivas. Este é o primeiro trabalho realizado de delimitação de espécies no gênero *Squalus*. Analisamos molecularmente as espécies *S. acanthias*, *S. suckleyi*, *S. albicaudus*, *S. cubensis*, *S. megalops*, *S. raoulensis*, *S. blainville*, *S. hemipinnis*, *S. edmundsi*, *S. japonicus*, *S. nasutus*, *S. griffini*, *S. grahami*, *S. montalbani*, *S. mitsukurii* e *S. chloroculus*. Foram obtidas 72 sequências a partir de amostras coletadas em diferentes localidades distribuídas no Oceano Atlântico, sendo eles na região da Costa dos Estados Unidos (n=11), no litoral brasileiro em Pernambuco (n=13), Rio de Janeiro (n=15) e na Costa da Argentina (n=33). Além disso, 645 sequências foram retiradas do banco de dados BOLD (Barcode of Life Data System) e inseridas nas análises de delimitação das espécies neste estudo. Inicialmente, 717 sequências foram alinhadas no programa Geneious, gerando uma matriz consenso de 16 espécies. No programa MEGA foi obtido uma árvore de Máxima Verossimilhança (MV). As análises de delimitação foram realizadas com os programas ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery), PTP (Poisson Tree Processes) e bGMYC (General Mixed Yule- Coalescente). Os resultados das análises de delimitação com ABGD e PTP, revelaram a existência de três grandes grupos evolutivos. Contudo, a análise bGMYC delimitou 11 unidades evolutivas, sendo 7 unidades representadas pelas espécies *S. acanthias*, *S. suckleyi*, *S. albicaudus*, *S. megalops*, *S. raoulensis*, *S. blainville*, *S. montalbani*. Além disso, as outras 5 unidades apresentaram conflitos taxonômicos, onde *S. hemipinnis* e *S. edmundsi* (1) foram considerados uma única unidade taxonômica, assim como *S. japonicus* + *S. nasutus* (2); *S. griffini* + *S. grahami* (3); *S. mitsukurii* + *S. chloroculus* (4) e *S. albicaudus* + *S. cubensis* (5), indicando um complexo de espécies. As informações obtidas neste estudo permitem sugerir que as unidades evolutivas que apresentaram conflitos taxonômicos, podem estar ocorrendo um processo recente de especiação.

Palavras-chave: Elasmobrânquios, COI, marcador molecular.

Financiamento: FAPESP, CAPES, CNPQ.

MOLECULAR RESPONSES OF SLOW AND FAST MUSCLE IN PACU JUVENILE DURING FASTING AND REFEEDING

Magiore, Isabelle C.¹, Paula, Tassiana G.¹, Zanella, Bruna T.T.¹, García, Geysson J.F.¹, Valente, Jéssica S.¹, Mareco, Edson A.², Carvalho, Robson F.¹, Dal-Pai-Silva, Maéli¹

¹ São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil.

² University of West São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

magioreisabele@outlook.com

The skeletal muscle constitutes a high percentage of body mass in a range of organisms. In mammals, muscles with distinct metabolic characteristics present different responses to same conditions. Unlike to observed in mammals, in fishes, this tissue is organized on well defined compartments. The slow compartment is composed of oxidative metabolism fibers, being recruited during slow and long duration actions, as migration. On the other hand, the fibers that constitutes fast compartment are required during fast movements, as predation and escape, besides presenting a glycolytic metabolism. Muscle tissue is the main protein reserve used in food shortages situations. The balance between protein synthesis (anabolism) and degradation (catabolism) controls muscle phenotype that can be modulated by extrinsic factors as food availability. Fasting periods are common in fishes, both in natural and artificial environments. During food restriction, there is an increase in the protein degradation pathways, which can lead to muscle atrophy. When the external sources of food are restored, a positive regulation of anabolism-induced genes occurs. In this sense, refeeding after fasting situations may be a strategy to reduce costs in aquaculture. Therefore, the aim of this study was to evaluate the different molecular responses between slow and fast muscles of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juvenile in the fasting and refeeding situation. To achieve our goal, pacu juveniles (150g) were distributed on 3 experimental groups (n:8/group): Control (continuous feed), Fasting (fasting during 10 days) and Refeeding (refeeding to 12 hours after the fasting period). We evaluated the expression of genes related to oxidative metabolism (*sdha* e *pgc1-α*), anabolism (*mtor* e *raptor*), catabolism (*fbxo25*) and anti-autophagy processes (*bcl2*) in slow and fast muscles. During fasting, fast and slow muscle presented a general similar anabolic and catabolic expression pattern. After refeeding, there was an increase in *pgc1-α*, *sdha*, *bcl2*, *raptor* e *mtor* gene expression and a decrease in *fbxo25* expression in slow compared to the fast muscle. Together, our data show that when external nutrients source are restored, slow muscle is able to recover the muscle phenotype faster compared to the fast muscle. We assume that this condition occurs due to the major use of slow muscle to sustain and maintain the animal in aquatic environment. Also, considering the high expression of the genes related to oxidative metabolism in slow muscle, we suppose that the food restriction protocol used did not affect the metabolic characteristics of this tissue.

Keywords: muscle, fish, metabolism, refeeding.

Grants: Research Foundation (FAPESP), grants 2013/25915-1 and 2014/16949-2; National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grants 148108/2018-0.

NORMAL FIBROBLASTS REDUCE miR-29b EXPRESSION AND INCREASE THE MOTILITY OF OVARIAN TUMOR CELLS

Medeiros, Mariana¹, Ribeiro, Amanda O.², Lupi Junior, Luiz A.³, Chuffa, Luiz Gustavo A.³, Delella, Flávia K.¹

¹São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brasil.

²São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Department of Genetics, Botucatu, São Paulo, Brasil.

³São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Department of Anatomy, Botucatu, São Paulo, Brasil.

mariana.medeiros1997@gmail.com

The ovary is responsible for producing hormones and germ cells. Malignant neoplasms of this organ are the fifth most common gynecological cancers, and the most lethal of all. The interactions between ovarian epithelial cells and their microenvironment are necessary for the maintenance of organ homeostasis, providing proliferative and migratory restrictions. During carcinogenesis, these restrictions are lost, and the stromal modification favors the tumor establishment. Fibroblasts, which are key cellular stromal components, become cancer-associated fibroblasts (CAFs) by the interaction with malignant cells, also contributing for a tumor-promoting microenvironment. In addition, the deregulated expression of microRNAs (small non-coding RNAs) is also correlated with tumor progression by controlling the expression of cell cycle and motility-related genes. Considering the importance of maintaining intact epithelial-stromal interactions to prevent tumor development and progression, the present study aimed at evaluating the influence of normal fibroblasts on the expression of microRNAs, cell migration, and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activity of ovarian cancer cells. SKOV-3 cells were co-cultured with normal human fibroblasts derived from primary culture. Cell viability by trypan blue, gene expression of tumor suppressor microRNAs (miR-16, miR-29b, miR-125b, miR-126) and oncomiRs (miR-21, miR-221, miR-222) by RT-qPCR, cell migration by wound healing assay, and analysis of MMP-2 activity by zymography were performed. Data were analyzed by t test (gene expression and zymography) or two-way ANOVA test and *post hoc* Tukey test (wound healing assay). Differences were considered significant at $p < 0.05$. Cell viability was not altered. Co-culture decreased miR-29b expression ($p=0.0017$), increased cell migration ($p<0.0001$) and MMP-2 activity ($p=0.015$). miR-29b negatively regulates MMP-2 expression. Thus, the decrease in miR-29b expression resulted in increased MMP-2 activity. The enhanced activity MMP-2 activity, in turn, is related to the increase of cellular motility, considering the effects of this collagenase on degradation and remodeling of basement membrane. In conclusion, these results show the influence of normal fibroblasts on tumor progression through increased cell motility and negative regulation of miR-29b tumor suppressor expression.

Keywords: Ovarian cancer, fibroblasts, co-culture, microRNA, cell motility.

CYP2C9 GENOTYPING FOR PHARMACOGENETIC TRIALS FROM SALIVA SAMPLES: A PILOT STUDY

Bolani, Bruna¹; Oliveira, Gabriela M.¹; Dionísio, Thiago J.¹; Santos, Carlos F.¹; Calvo, Adriana M.¹

¹Department of Biological Science, Bauru School of Dentistry,
University of São Paulo

bruna.bolani@usp.br

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) use is associated with serious adverse drug reactions and genetic factors are among the aspects that can influence the individual response. CYP2C9 is a gene, member of P450 cytochrome superfamily, that are responsible, among other genes, for the codification of enzymes that metabolizes most of NSAIDs and is highly polymorphic. Literature points that variants in this gene imply in decrease of NSAIDs metabolism, increasing the possibility of adverse effects. Thus, it is extremely important understand the genetic variations to allow the personalization of drug therapy, guaranteeing satisfactory effectiveness and minimal side effects. This is a reality in several areas in medicine and dentistry. The aim of this study was genotyping CYP2C9 and its most clinically relevant allelic variants (CYP2C9*2 and CYP2C9*3). For this, the DNA Extract All Reagents Kit (catalog number 4402616, Applied Biosystems®) was used in frozen saliva samples from 50 volunteers and genotyping of CYP2C9 was performed by the detection of single nucleotide polymorphism (SNP) by real-time PCR technique with pre-fabricated and validated tests by Thermo Fisher® (catalog C_2562505_10 and C_27104892_10). The results obtained were 32 ancestral homozygous (CYP2C9*1/*1), corresponding to 64% of the sample, and 18 volunteers mutated for CYP2C9, 36% of the sample. The variants found for CYP2C9 were: CYP2C9*1/*2 (11 volunteers), CYP2C9*2/*2 (2 volunteers), CYP2C9*1/*3 (4 volunteers) and CYP2C9*2/*3 (1 volunteer). Although the research did not aim to constitute a population study, the percentages found were discreetly different than those already established, illustrating what has already been pointed out in the literature: the Brazilian population is highly heterogeneous and mixed, each region of the country constituting a distinct population history and pre-established pharmacogenetic models based on imported ethnic patterns do not adequately represent the Brazilian population. Therefore, the investigation of these genetic variants guides to the most appropriate drug and dosage for each patient, reducing the risk of adverse effects.

Financial support: FAPESP (2018/02556-0).

Keywords: NSAID. CYP2C9. Genotyping.

UTILIZAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE MICROSATÉLITES PARA CARACTERIZAÇÃO DE DUAS POPULAÇÕES DE *Hyphessobrycon boulengeri*.

Soares, Leticia B.¹, Paim, Fabilene G.¹, Nobile, Maria L. M. O.¹, Foresti, Fausto¹, Oliveira, Claudio.¹

¹ Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências (IBB), UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

leticia.unesp@hotmail.com

Uma grande parte do genoma das espécies é constituída por sequências repetitivas, dentre elas encontramos os microsátélites, composto de um a seis nucleotídeos em tandem, sendo os mono e dinucleotídeos encontrados em mais abundância. Buscando compreender como essas sequências simples repetitivas (SSRs) ou microsatélites se comportam no genoma, o presente estudo teve como objetivo utilizar três classes de sequências repetitivas (GA)₁₅, (CA)₁₅ e (TTA)₁₀ para distinguir duas populações de *Hyphessobrycon boulengeri* coletadas no município do Bertioga e outra em Iguape, São Paulo. Cromossomos metafásicos provenientes de cultura de células com número diploide de 2n=50 cromossomos foram submetidos à técnica de FISH para mapeamento das sequências repetitivas, e sequencialmente a técnica de Bandamento C foi realizada nas metáfases para evidenciar o padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva em ambas populações. Foram encontrados dois padrões de distribuição dos microsátélites nas populações de *H. boulengeri*: um padrão disperso e um clusterizado nos cromossomos. O dinucleotídeo (GA)₁₅, em ambas populações de *H. boulengeri*, exibiu marcas conspícuas e clusterizadas nas regiões terminais. Já o dinucleotídeo (CA)₁₅, em relação à população de *H. boulengeri* de Bertioga, apresentou marcações não conspícuas na região terminal, porém, essas sequências não foram localizadas nos cromossomos da população de *H. boulengeri* de Iguape. O trinucleotídeo (TTA)₁₀ exibiu marcações não conspícuas e dispersas pelos cromossomos na população de *H. boulengeri* de Bertioga, contudo, na população de Iguape não foi observada nenhuma marcação nos cromossomos. Quanto à banda C, na população de *H. boulengeri* de Iguape, foi possível observar seis pares cromossômicos com blocos de heterocromatina evidenciados nas regiões pericentroméricas e apenas um par cromossômico na região terminal, enquanto na população de Bertioga esses blocos estão evidenciados na região pericentromérica de quase todos os cromossomos e somente um par de cromossomo apresentou marcação na região terminal. Assim, a utilização de sequências repetitivas tais como os microsátélites podem ser considerados um bom marcador para caracterizar as populações de *H. boulengeri*, pois é possível notar a presença ou ausência dos dinucleotídeos (GA)₁₅ e (CA)₁₅ e trinucleotídeo (TTA)₁₀ mais evidentes em uma população do que na outra. Além disso, os blocos de heterocromatina apresentam distribuições muito semelhantes aos observados na literatura para outras espécies de *Hyphessobrycon*.

Palavra chave: microsátélite, bandamento C, FISH, cultura celular.

Apoio: Fapesp

EVALUATION OF PARATRANGENESIS POTENTIAL OF ENDOSYMBIONT *Asaia* spp. IN *Anopheles stephensi* AND *Anopheles gambiae*

Bernardes, Isabella A. F.¹; Damiani, Claudia²; Favia, Guido²; Ribolla, Paulo E. M.¹.

¹UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), Laboratório Pangene, Instituto de Biotecnologia de Botucatu (IBTEC), Botucatu, SP, Brazil

²UNICAM (Università di Camerino), School of Biosciences and Veterinary Medicine, Camerino, MC, Italy.

isabella_ariadne@hotmail.com

Malaria represents an important insect-borne disease with an estimated incidence of 219 million cases occurred worldwide and 435 000 deaths globally in 2017. Several factors contribute to the severity of this illness, among which the emergence of drug-resistant parasites and insecticide-resistant mosquitoes strains. Faced with these problems, an alternative method to control malaria transmission is paratrangenesi. It has been demonstrated that an α -proteobacterium of the genus *Asaia* is stably associated with larvae and adults of *Anopheles stephensi*, major malaria vector in Asia, and has the main features needed for this technique. Recently, it was disclosed that the strain isolated from the main malaria vector in Brazil, *An. darlingi*, has a genome reduction in comparison with other isolates, which could be due to a longer and more intense evolutionary relationship between symbiont and mosquito host. Therefore, the aim of the research was to evaluate the potential of this new *Asaia* spp. strain in paratrangenesi for *An. stephensi* and *An. gambiae* through the transformation of the strain with DsRed gene and re-colonization of these mosquitoes species in order to screen for efficient infection in these vectors. The strain was successfully transformed using a shuttle vector and the recolonization was based on mosquito feeding on cotton pads soaked with sugar solution 5%, kanamycin [100ug/ml] and the fluorescent bacteria, *Asaia-darlingi* dsRed and GFP *Asaia* isolated from the corresponding mosquito species as control. Mosquitoes fed with *Asaia* spp. cells were sampled every 2–3 days up to 15 days after initial exposure to the bacterium, collected, dissected and used to prepare slides containing the gut and reproductive organs from each mosquito, which were analyzed using a fluorescent and a laser scanning confocal microscope. The overall data indicated that the bacteria isolated from *An. darlingi* is dominant and stably associated with, the midgut of *An. stephensi* and *An. gambiae*, hence it could be an interesting vector to express anti-parasite molecules in mosquitoes by the method of paratrangenesi.

Key words: paratrangenesi, *Asaia*, endosymbiont, malaria

Apoio financeiro: FAPESP

PROTEOMIC ANALYSIS OF THE SLOW MUSCLE OF PACU SUBMITTED TO PROLONGED FASTING AND REFEEDING

Kuniyoshi, Maria L.G.¹; Silva-Gomes, Rafaela N.¹; Mareco, Edson A.²; Salomão, Rondinelle A. S.²; Carvalho, Robson F.¹; Santos, Lucilene D.³; Dal-Pai-Silva, Maeli¹.

1 Department of Morphology, Institute of Bioscience of Botucatu, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

2 University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

3 Center for the Studies of Venoms and Venomous Animals (CEVAP), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

maria.kuniyoshi@unesp.br

The skeletal muscle has diverse molecular mechanisms that permit acclimation to changes in diet as in fasting followed by refeeding condition. In fish, muscle fibers are segregated into the fast, intermediate and slow compartments, the latter composed by slow-twitch fibers with oxidative metabolism. In this work, we performed a proteomic and bioinformatic analysis of the slow muscle of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a fish widely consumed in Brazil. For this purpose, we submitted juvenile (~100g) pacus to 30 days of fasting followed by 30 days of refeeding. A control group of normally fed fish was used as reference. After the experimental condition, slow muscle samples were collected and their proteins were extracted. The samples were digested with trypsin, pooled (n = three pools with three animals each) and analyzed with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The peptides were identified with the software Mascot Distiller, and the software Scaffold was used to obtain the fold change of fasted/refed fish in comparison to control animals. Proteins with fold change ≥ 1.5 or ≤ 0.6 were considered upregulated or downregulated, respectively. Interaction networks of the differentially expressed proteins were built with STRING software. The results showed 169 proteins identified after fasting (30 days), of which 24 were upregulated and 18 were downregulated. The STRING analysis showed three small functional clusters with sarcomere proteins, glycolytic metabolism proteins and oxidative metabolism proteins. Examples of differentially expressed proteins were myosin-7, actin-1 and pyruvate kinase (downregulated) and triosephosphate isomerase and enolase (upregulated). As for 30 days of refeeding, 170 proteins were identified, of which 17 were upregulated and 21 were downregulated. The STRING interaction networks showed two small clusters, which contained proteins of the oxidative and glycolytic metabolisms. Some of the differentially expressed proteins were creatine kinase, citrate synthase (downregulated), tropomyosin and acetyl-CoA acetyltransferase (upregulated). The low number of differentially expressed proteins show that possibly, slow muscle is well-conserved during fasting and refeeding condition. Furthermore, the differential expression of metabolic proteins suggest that slow muscle has a major role in the acclimation of metabolism during changes in diet. These findings have significant implications for the understanding of slow muscle biology and its response to nutrients availability.

Keywords: Muscle, fasting, refeeding, proteomics.

Funding: The authors received financial support from FAPESP (grant 2017/12237-6) CAPES and CNPq.

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA SEXAGEM RÁPIDA DO
PIAUÇU *Megaleporinus macrocephalus*: SUBSÍDIOS PARA AQUICULTURA**

Ramos, Lucas F. P.¹, Silva, Duílio M. Z. A.¹, Melo, Silvana.¹, Goes, Caio A. G.², Oliveira, Claudio.¹, Porto-Foresti, Fábio.², Foresti, Fausto.¹, Hashimoto, Diogo T.³, Utsunomia, Ricardo.^{1,2}

¹Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Departamento de Morfologia ² Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências, Departamento de Ciências Biológicas ³Centro de Aquicultura da Unesp

lpr.lucas@gmail.com

Marcadores genéticos sexo-específicos são importantes ferramentas não-invasivas para avaliar o sexo dos indivíduos de determinada espécie. Na aquicultura, o desenvolvimento deste tipo de marcador gera perspectivas interessantes, como a possibilidade de identificação sexual precoce, como forma de controlar a proporção sexual do plantel, principalmente em espécies sem dimorfismo sexual, além de permitir a identificação genética do sexo em tratamentos com hormônio e temperaturas distintas. *Megaleporinus* é o único gênero utilizado na aquicultura brasileira que apresenta cromossomos sexuais heteromórficos do tipo ZZ/ZW, mas a identificação do sexo genético até o presente momento exigia a obtenção de cromossomos mitóticos metafásicos. A recente descrição do satelitoma (e.g. conjunto total de DNAs satélites de um genoma) da espécie *Megaleporinus macrocephalus*, conhecida popularmente como piauçu, revelou a presença de pelo menos 23 DNAs satélites clusterizados no cromossomo W desta espécie. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi padronizar um protocolo experimental não-invasivo para a sexagem múltipla de indivíduos desta espécie, por hibridação *in situ* fluorescente (FISH) e/ou PCR quantitativa (qPCR). Destaca-se que para todos os experimentos foram utilizados indivíduos controle (N=20) e de diferentes pisciculturas (N=10). (i) Para a FISH, suspensões celulares foram obtidas de uma única escama ou fragmento de nadadeira em fixador Carnoy, sendo possível pingar até 6 suspensões celulares distintas em uma única lâmina. Posteriormente, duas sondas de satDNAs foram marcadas com um mesmo fluorocromo e usadas na FISH, uma que está clusterizada em um par autossômico (MmaSat98-37) e outra clusterizada no cromossomo W (MmaSat97-39). Após um período de 15 minutos de hibridização (sonda-cromossomo), as lâminas foram submetidas a enxagues de alta stringência e checadas em microscópio de fluorescência. Os resultados mostram que as células de todos os machos apresentam duas marcações, enquanto as células das fêmeas apresentam três marcações, caracterizando-se como um método 100% confiável de sexagem. (ii) Para a qPCR, o DNA genômico de diferentes amostras foi extraído e submetido à quantificação relativa do MmaSat97-39 (clusterizado no cromossomo W) em relação ao gene *hprt* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*), evidenciando que este satDNA está 10-20 vezes mais abundante em genomas de fêmeas do que de machos e também caracterizando-se como uma ferramenta 100% efetiva na identificação de sexo. Os dados apresentados aqui revelam que ambas as abordagens aplicadas foram 100% eficazes em identificar o sexo dos indivíduos amostrados e, embora uma PCR convencional fosse mais prática para aquicultura, nossas abordagens são indicadas, inclusive, para a detecção de superfêmeas (WW).

Palavras – chave: FISH, Piauçu, DNA, Cromossomos, satélites.

Apoio: UNESP, CAPES, CNPq, FAPESP.

EXPRESSÃO DE GENES DE REPARO DO DNA APÓS O TRATAMENTO COM ISOTIOCIANATO DE ALILA EM CÉLULAS DE CARCINOMA UROTELIAL

Magalhães, Phillipe F.C. ^{1,2}; Savio A.L.V. ¹; Silva G.N. ³; Salvador D.M.F. ¹.

1 Faculdade de Medicina- Unesp- Botucatu; 2 Universidade Paulista- UNIP- Bauru; 3 Universidade Federal de Ouro Preto- UFOP- Ouro Preto.

phillipefcm@gmail.com

O carcinoma urotelial representa um dos tipos de tumores de maior custo para o sistema de saúde, devido a alta taxa de recorrência e o necessário acompanhamento clínico de rotina. Protocolos quimioterápicos para carcinoma urotelial incluem drogas que induzem dano no DNA, e que levam ao descontrole do ciclo celular, apoptose e no sistema de reparo do DNA. Nos últimos anos, tem crescido o interesse pela identificação de compostos naturais com potencial medicinal. O isotiocianato de alila (AITC), encontrado em plantas da família *Cruciferae* e composto majoritário da semente de mostarda, vem sendo avaliado quanto a sua atividade antineoplásica em bexiga devido à sua alta biodisponibilidade na urina após ingestão. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão de genes de reparo no DNA em linhagens celulares de carcinoma de bexiga após o tratamento com o AITC. Foram utilizadas duas linhagens celulares de carcinoma de bexiga com diferentes *status* do gene *TP53* (RT4 – *TP53* selvagem / T24 – *TP53* mutado). Os tratamentos com o AITC foram conduzidos nas concentrações de 62,5, 72,5, 82,5 e 92,5 μM , por 24 horas. Para análise de expressão dos genes envolvidos no reparo do DNA foram utilizadas placas de *PCR array* (Bioscience) específicas, contendo 84 genes alvos, 6 genes endógenos e 6 controles de placa. O tratamento com o AITC resultou na diminuição da capacidade de formação de colônias em ambas as linhagens celulares. Em relação ao perfil de expressão, foram observadas alterações em 7 genes. Na linhagem RT4 ocorreu a hiperexpressão dos genes *LIG4* (que atua no reparo de quebra de fita simples e dupla do DNA), *RAD54L* (função na recombinação homóloga do DNA) e *RFC1* (codifica ATPase fundamental para a replicação e reparo do DNA), e a hipoexpressão de *UNG* (codifica uma glicosilase que elimina resíduos de uracila do DNA), *APEX1* (codifica endonuclease multifuncional no reparo do DNA), *MRE11A* (codifica nucleasse que atua no reparo de fita dupla) e *RPL13A* (codifica proteína ribossomal). Na linhagem T24, foi observada a hiperexpressão do gene *XRCC2*, que codifica proteínas relacionadas à recombinação homóloga, para a manutenção da estabilidade cromossômica e reparo do DNA. Em conclusão, o AITC apresenta efeito antiproliferativo e atua na modulação de diferentes genes de reparo do DNA a depender do *status* do gene *TP53* na linhagem celular.

Palavras-chave: atividade antineoplásica, câncer de bexiga, toxicogenômica

Apoio Financeiro: CNPq /FAPESP

APLICAÇÃO DE DNA METABARCODING NA IDENTIFICAÇÃO DE ICTIOPLÂNCTON NO RIO MOGI-GUAÇU

Costa; Gabriela O.¹, Nobile; André B.¹, Freitas-Souza; Diogo¹, Oliveira, Maria Lígia M, Lima; Felipe P.¹, Foresti; Fausto¹, Oliveira; Claudio¹

¹Instituto de Biociências – UNESP, Departamento de Morfologia, Botucatu, São Paulo, Brasil;

gabi_glau1307@hotmail.com

O Brasil apresenta a mais rica ictiofauna do mundo, resultado de sua grande extensão e diversidade de habitats. Entretanto, nas últimas décadas, com o aumento populacional houve o impulsionamento da construção de inúmeras hidrelétricas pelo país, tornando-se um dos impactos antrópicos mais alarmantes para essa diversidade. Diante disso, destaca-se a importância de estudos que auxiliem no conhecimento da biologia reprodutiva dos peixes, indicando áreas e período reprodutivo preferenciais, possíveis rotas migratórias e sucesso no recrutamento. Perante isso, estudos relacionados ao ictioplâncton, vêm agregando dados valiosos para o monitoramento ecológico, análises de impactos ambientais e desenvolvimento de planos de conservação e manejo. Entretanto, a sistemática tradicional apresenta limitações na identificação destes organismos, visto que ovos não apresentam caracteres diagnósticos em nenhum estágio e das larvas capturadas não apresentarem caracteres diagnósticos formados, permanecendo sem identificação. Sendo assim, ferramentas moleculares como o DNA barcode, que utilizam o gene mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I (COI), vem se apresentando como uma ferramenta contundente na identificação das espécies, contudo, esta metodologia depende muito tempo e alto custo por amostra, tornando-se inviável em estudos extensivos. Desta forma, este estudo teve como objetivo, propor a técnica de DNA metabarcoding (sequenciamento massivo de pool de organismos) e sequenciamento de nova geração, como alternativa ao DNA barcode e sequenciamento de Sanger, visando estabelecer um protocolo eficiente e com melhor custo-benefício. Para isso, foram realizadas coletas em trechos do rio Mogi-Guaçu durante ciclos reprodutivos. A extração do DNA total de 216 indivíduos, sendo 96 ovos e 120 larvas, foi feita usando Kit de extração Qiagen, e realizado a amplificação da região COI com primers acoplados a um adaptador MiSeq e (identificador múltiplo (MID)). Em seguida, estas amostras foram sequenciadas num sequenciador Illumina Miseq. Como resultado foi possível a identificação de 28 espécies, 11 famílias e 3 ordens, sendo as espécies mais frequentes: *Pimelodus maculatus* (57,3%), *Leporinus friderici* (11,8%), *Cheirodontinae sp.* (6,14%) e *Megaleporinus obtusidens* (4,9%), sendo que a primeira e quarta espécie, respectivamente, são migradores de longas distâncias. Com os dados gerados, foi possível identificar e obter de forma quantitativa, as espécies encontradas na amostra, evidenciando a eficácia da técnica e a funcionalidade do protocolo utilizado, de forma que, foi possível gerá-los em um período de tempo menor e com um custo inferior, viabilizando a produção de dados mais sólidos, através da identificação de todos os indivíduos capturados.

Palavras-chave: Conservação de peixes, NGS, recurso pesqueiro.

Suporte financeiro: CAPES, FAPESP, and CNPq.

MONET - APLICATIVO PARA VISUALIZAÇÃO DE INTERAÇÕES MOLECULARES EM AMBIENTE DE REALIDADE VIRTUAL

Faine-Monteiro, Jorge H.¹; Pilan, José R.¹; Takeda, Agnes, A.S.¹; Rybarczyk-Filho, José, L.¹.

¹Dep. de Física e Biofísica, IBB, UNESP, SP;

jhfm.13@gmail.com

Vias metabólicas podem ser representadas na forma de uma rede de interação entre metabólitos, proteínas ou outros elementos. Sendo assim, o funcionamento de uma célula implica em interações que compõem uma rede intrincada e complexa. A maioria dos atuais aplicativos de visualização de redes não permitem uma visualização em três dimensões, ou seja, numa grande parte a representação da rede é planar (duas dimensões). Neste trabalho desenvolvemos um aplicativo para *smartphones* que permite a visualização de redes em três dimensões, possibilitando que o usuário tenha uma imersão em ambiente de Realidade Virtual proporcionando uma melhor experiência da análise da rede. O aplicativo foi desenvolvido utilizando a *Game Engine* Unity3D, a escolha dessa *engine* foi devido a facilidade de criar ambientes em três dimensões, exportação para diversas plataformas de *smartphone* e integração facilitada com tecnologias de Realidade Virtual. Para obtenção das redes, foi utilizado o STRING *database* que é repositório de informações de interação proteína-proteína de 5090 organismos. Os dados são obtidos em tempo real conforme a *query* informada pelo usuário. O *layout* da rede de interação é fornecida por um algoritmo adaptado da metodologia *Force-directed graph drawing* que distribui as proteínas ao longo do espaço virtual permitindo uma melhor visualização da rede. O usuário pode utilizar zoom, rotacioná-la e até focar em alguma proteína específica permitindo a visualização dos seus respectivos vizinhos. O usuário pode utilizar o *cardboard* em conjunto com o seu *smartphone* para visualizar a rede em ambiente de Realidade Virtual, permitindo assim obter uma visualização mais aprofundada. O aplicativo ainda se encontra em sua primeira versão apenas demonstrando as interações do tipo proteína-proteína, porém futuramente existe a possibilidade de expansão para outros bancos de dados da *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL), tais como o STITCH que fornece interação de pequenas moléculas e proteínas, e o STRING viruses que fornece as interações proteína-proteína entre vírus e hospedeiro.

Palavras-chave: Redes Biológicas, Realidade Virtual, Aplicativo, Proteína.

IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE NADADEIRAS DE TUBARÕES APREENDIDAS . EM NATAL – RN

Cotrim, Ana P. M.¹; Prado, Fernanda D. ¹, Porto-Foresti, Fábio¹

¹Universidade Estadual Paulista (Bauru), Departamento de Ciências Biológicas.

anaa_cotrim@hotmail.com

Atualmente, a indústria pesqueira é apontada como a protagonista da problemática relacionada ao declínio das populações de tubarões, em comparação à outras formas de ameaça - degradação do ambiente, poluição e mudanças climáticas. Essa situação é acentuada pelo alto consumo da barbatana desses animais pelo mercado asiático, tendo em vista que a sopa da mesma é um prato refinado e frequentemente consumido por parte da elite chinesa. Por isso, na maioria das vezes, as apreensões feitas pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) são apenas as nadadeiras isoladas, o que impossibilita o reconhecimento morfológico da espécie. Portanto, é necessário a utilização de métodos genético-moleculares – mais especificamente a técnica do DNA Barcode - para auxiliar a identificação correta dos animais, independentemente de sua morfologia. Sendo assim, o presente trabalho objetivou identificar corretamente as espécies de tubarões capturados por embarcações pesqueiras localizadas no litoral de Natal, capital do estado do Rio Grande do Norte. Foram selecionadas trinta e quatro amostras de tecido (músculo de barbatana). Extraíu-se o DNA do material biológico aumentando em 12h o tempo de banho maria (60°C) em relação ao protocolo padrão (2h) de extração para peixes. Posteriormente, o gene COI (Citocromo oxidase I) foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) usando os primers FishF1 e FishR2 e visualizado em gel de agarose 2%. As amostras que obtiveram maior êxito, foram sequenciadas e analisadas nas plataformas BOLD (www.boldsystemes.org) e BLAST (www.blast.ncbi.gov). Observou-se que três das amostras analisadas, apresentaram 100% de similaridade com indivíduos da espécie *Isurus paucus*, conhecido popularmente como “Anequim-preto”. Segundo a IUCN (International Union Conservation of Nature) o estado de conservação desta espécie é vulnerável. Os dados apresentados reafirmam a necessidade de estudos voltados para a identificação correta das nadadeiras e a importância ímpar da genética neste processo. O trabalho em questão compreende, não só o reconhecimento das espécies de cações, como também fornece informações fundamentais para projetos que visam a preservação e conservação de populações de tubarões ao longo da costa brasileira.

Palavras-chave: DNA Barcode; cações; preservação.

IN SILICO SCREENING OF BIOACTIVE FATTY ACIDS FROM ROYAL JELLY AS POTENTIAL HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS (HDACi)

France, Fernanda A. S.¹, Assumpção, João H. M.¹, Rainho, Cláudia A¹.

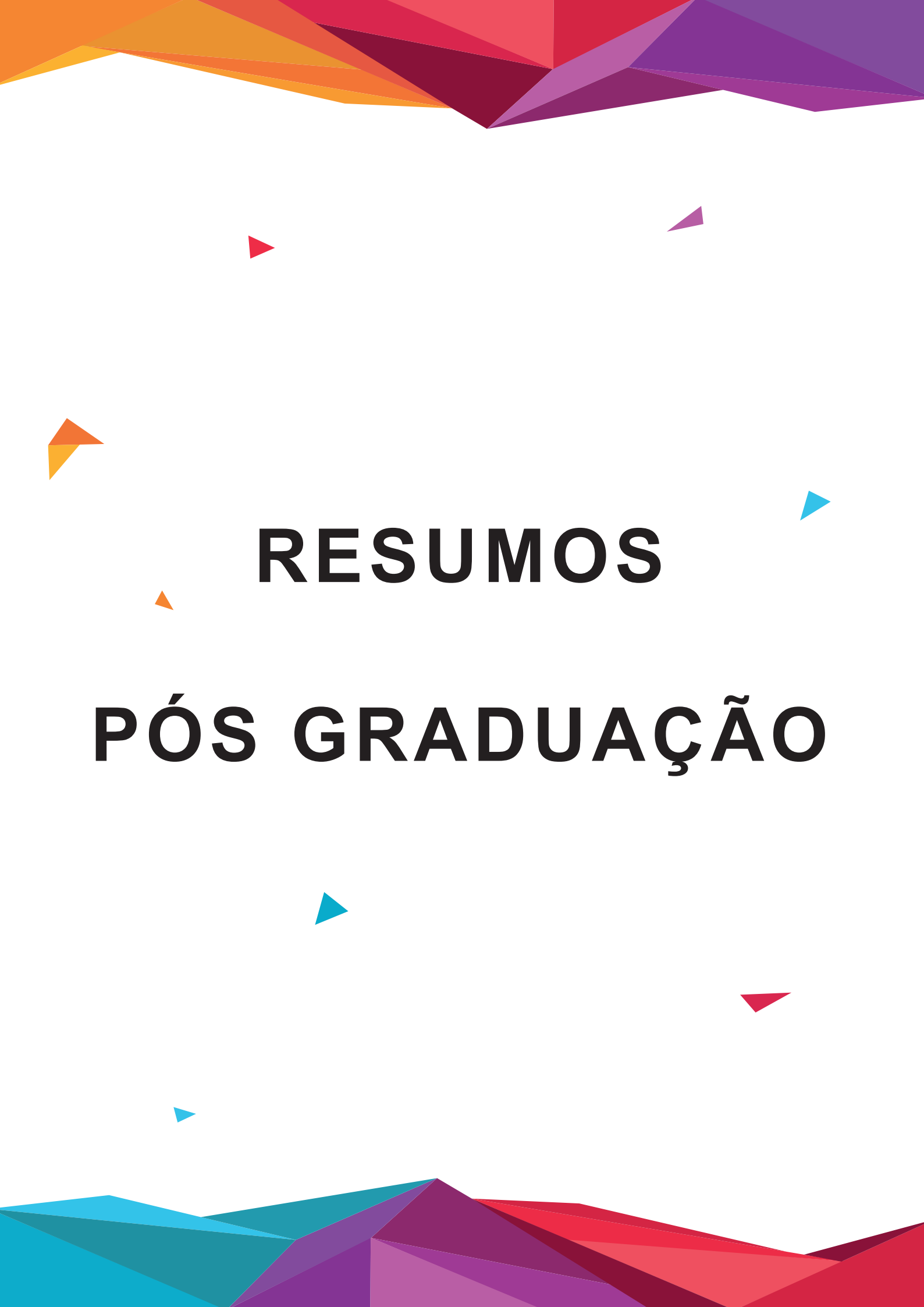
¹Department of Genetics, Institute of Biosciences of Botucatu, Sao Paulo State University (UNESP)

fernandafrance05@gmail.com

Reversible histone acetylation on ϵ -acetyl-lysine residues, modulated by the opposing activities of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), plays an important role in chromatin structure and gene expression. HDAC inhibitors (HDACi) for epigenetic therapy are under development due to their potential antitumor activity. The human HDACs are a group of enzymes classified into two families: sirtuins (SIRT1-7) and classical HDACs (HDAC1-11). Data from TCGA (The Cancer Genome Atlas) provide evidence that HDACs 1, 2, 8, 10 and 11 are overexpressed in breast cancer patients. Additionally, data from RefExA (Reference database for gene Expression Analysis) suggest that the breast cancer cell line MCF-7 expresses high levels of HDACs 1, 2, 8 and 11. Studies of honeybee caste development implicated the 10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA), a fatty acid derived from royal jelly (RJ), as an HDACi. The aims of this study were to investigate the potential antitumor activity of 10-HDA in breast cancer cell lines and to evaluate the possible interaction of other fatty acids in RJ with HDACs. The effect of 10-HDA in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines was evaluated by the MTT assay, after *in vitro* exposure at different drug concentrations (0.001 μ M-1000 μ M) for 24h, 48h, 72h and 96h. To characterize the possible interactions of 28 fatty acids derived from RJ with HDACs 2 (PDB-ID:4LXZ) and 8 (PDB-ID:1T69), we performed a virtual screening based on molecular docking (Autodock Vina 1.1.2). No cytotoxic effect of 10-HDA was detected after treatment of cell lines (two-way ANOVA and Dunnett's test, $p < 0,05$ for statistical significance). Among the fatty acids, five [3-Hydroxy-dodecanedioic acid (CID: 16663321), 3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl) propionic acid (CID: 14340), 9-Hydroxydecanoic acid (CID:4575239), 10-Acetyloxydecanoic acid (CID: 13497206), and 2-decene-1,10-dioic acid (CID: 181528)] show the best occupancy of HDAC2 catalytic site and lower negative free energy binding. The predictions also indicated the interactions between them and important amino acid residues in the catalytic domain, such as His145, Asp181, Asp179, His183, Asp269 and the Zn²⁺ atom. Contrarily, the molecular docking of HDAC8 indicates that the selected compounds may have low affinity with the catalytic site of this protein. Although the cell viability assay suggests no effect of 10-HDA on the breast cancer cell lines, the virtual screening data predicts that other fatty acids derived from RJ may act as HDACi. Given the importance of honeybee products as sources of drug discovery, the selected fatty acids could be considered HDACi candidates for future experimental validation.

Keywords: HDAC, royal jelly, molecular docking, epigenetic therapy.

Financial support: This study was financed in part by CNPq and CAPES (Finance Code 001).



RESUMOS

PÓS GRADUAÇÃO

ANÁLISES *IN SILICO* DA METALOTIONEÍNA-1 (MT-1) EM ORGANISMOS ANIDROBIÓTICOS VERSUS NÃO ANIDROBIÓTICOS

Contiliani, Danyel F.^{1,2}, Pereira, Tiago C.^{1,2}

¹Depto. de Biologia, FFCLRP - USP, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Genética, FMRP - USP, Brasil

danyel.contiliani@usp.br

Na natureza, alguns organismos possuem a capacidade de adentrar em um estado de animação suspensa, denominado anidrobiose (do grego “vida sem água”), quando expostos a dessecação extrema. Durante o estado seco, estes apresentam tolerância a uma variedade de estresses, como extremos de temperatura, alta pressão hidrostática, radiação ionizante e vácuo. Para isto, estes organismos são capazes de sintetizar diferentes moléculas (*e.g.*, proteínas e sacarídeos) essenciais para a proteção das células. Uma vez que em solos secos a concentração de íons acaba se elevando, acredita-se que organismos anidrobióticos possuem estratégias para a manutenção da homeostase iônica. Metalotioneínas (MTs) são proteínas de curtas cadeias, presentes em um amplo espectro taxonômico, responsáveis pela homeostase e detoxificação de metais pesados por meio das interações de seus resíduos de cisteínas com íons metálicos fisiológicos e xenobióticos. Portanto, o propósito deste estudo foi realizar análises *in silico* da proteína metalotioneína-1 (MT-1) e verificar o seu possível papel em cenários de dessecação extrema. As análises consistem na busca de homólogos de MT-1 em anidrobiontes e não-anidrobiontes por meio da ferramenta BLAST, alinhamento de múltiplas sequências peptídicas via Clustal Omega, análises de regiões conservadas, composição de resíduos via BioEdit v7.0.5 e predições de sítios de ligações a íons metálicos via IonCom. Embora a análise da composição de resíduos não tenha mostrado uma diferença significativa no percentual de cisteínas entre as MTs de ambos os grupos, os alinhamentos mostraram um grau maior de conservação destes resíduos em anidrobiontes. Além disso, MT-1 de anidrobiontes e não-anidrobiontes mostraram uma maior afinidade a íons Zn^{2+} do que a Cu^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} , devido ao número superior de resíduos ligantes a estes metais. Dessa forma, sugere-se que MTs de anidrobiontes possam carregar assinaturas que as tornam mais eficientes em contextos de seca extrema, favorecendo à sobrevivência destes organismos. Adicionalmente, também é sugerida a classificação de MT-1 como Zn-tioneína devido à sua forte interação com íons Zn^{2+} . Estes resultados somados às futuras análises deste projeto poderão elucidar os mecanismos de resistência a metais pesados, orquestrados pelo fenômeno da anidrobiose.

Palavras-chave: anidrobiose, metais, dessecação, íons

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO RS334 CAUSADOR DA ANEMIA FALCIFORME E SUAS CONSEQUÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Passos, Marília R. S.^{1,2}; Weiss, Emiliana^{1,3}; Andrade, Heloísa S.^{1,3}; Yoshida, Edson H.⁴; Miranda Junior, Messias⁴

¹ Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, Unidade de Pesquisa Experimental, Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu – SP, Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Brasil;

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Brasil;

⁴ Faculdade Sudoeste Paulista - FSP, Campus Itapetininga - SP, Brasil.

mariliapassosbio@hotmail.com; messias_miranda@yahoo.com.br

A anemia falciforme é causada por um *SNP missense* (rs334), que substitui uma Timina por Adenina no 11p15.5 da cadeia β de globina, que gera uma hemoglobina mutada (Hemoglobina S), afeta a solubilidade da hemoglobina e promove a sua cristalização em condições de hipóxia, diminuindo a maleabilidade e aumentando a afinidade eritrocitária pelo epitélio, o que dificulta a perfusão dos tecidos adjacentes. A cristalização acarreta no formato eritrocitário de foice, que pode ser observado em exames diagnósticos, assim como a hiperatividade dos órgãos responsáveis pela degradação de células falcizadas. Os objetivos foram determinar a frequência do genótipo causador da doença nas populações dos 5 continentes presentes no banco de dados do Projeto *1000Genomas* e observar os níveis de degradação e variação eritrocitárias no paciente e no portador do traço. Para isso, foram utilizados os dados de variabilidade descrita para 2.504 indivíduos presentes no banco de dados do Projeto, no segmento 11:5247732-5248732(hg37), usando os *softwares* VCFtools e VCFX para calcular a frequência alélica do *SNP*, a frequência genotípica e HWE. Para os exames foram colhidos 6 mL de sangue periférico de 3 indivíduos (1 indivíduo para cada genótipo) em tubos com EDTA e tubos secos. Os hemogramas foram realizados no analisador hematológico ABX Micros 60 e os exames de marcadores hepáticos no analisador bioquímico Cobas Mira S. Foram realizados esfregaços sanguíneos, teste de falcização com Metabissulfito de Sódio a 2% e contagem de reticulócitos com Azul de Cresil Brilhante. Através das análises, as frequências encontradas nas populações para a presença do T>A foram: 9.22% em Africanas, 0.72% nas Ameríndias e, para as populações Europeia, SAS e EAS, esse polimorfismo não foi encontrado, consentindo com o esperado pois, assim como as populações africanas, as ameríndias também possuem seleção por patógeno. Os resultados das análises bioquímicas mostraram que os níveis de Bilirrubina, DHL e Fosfatase Alcalina no homocigoto e no heterocigoto para a doença indicam hiperatividade hepato-esplênica, assim como as alterações morfológicas eritrocitárias, a ocorrência de falcização e o número aumentado de reticulócitos no paciente e no portador, indicando associação do rs334 com a anemia falciforme, em ambos os casos. Com esses dados, podemos inferir que a presença desse *SNP* em populações ameríndias, que podem ser extrapolados para a população brasileira, exige uma maior atenção nas políticas de saúde pública, uma vez que nos pacientes foi constatada a gravidade da expressão desse *SNP*.

Palavras chave: *SNP*; Anemia Falciforme; *1000Genomas*

POLYMORPHIC VARIANTS IN THE *MMP-2* GENE AND THE NON-SYNDROMIC CLEFT LIP AND PALATE: A PILOT STUDY OF THEIR POSSIBLE ASSOCIATION

Queiroz, Thaís B.¹; Olano-Dextre, Tulio L.¹; Silva, Carolina M.¹; Pereira, Maria C. M.¹; Gonçalves, Andréa G. B.¹; Mateo-Catillo, José F.¹; Neves, Lucimara T.²

¹Post-Graduation Program in Rehabilitation Sciences, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo (HRAC/USP). Bauru, São Paulo, Brazil.

²Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo; Post-Graduation Program in Rehabilitation Sciences, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo (HRAC/USP). Bauru, São Paulo, Brazil.

thaisqueiroz@usp.br

The matrix metalloproteinases (MMPs) represent the main class of enzymes responsible for the degradation of extracellular matrix components, promoting cell proliferation and migration. This is necessary for adequate tissue morphogenesis during craniofacial and palate development. Literature points to an association between some polymorphisms in *MMPs* and cleft lip and palate (CLP) – a congenital anomaly that compromises the correct formation of lip and/or palate structures, and whose etiology is multifactorial, involving the interaction of environmental and genetic factors. The *MMP-2* gene has been especially associated with the modulation event during remodeling of the extracellular matrix in palatogenesis. And recently, in children with bilateral complete cleft palate, an increased expression of *MMP-2* was detected in their facial tissue. In light of this, the present study aimed to investigate if there is an association between the polymorphic variants rs243865, rs2285053 and rs2287074 in the *MMP-2* gene and CLP. For this, a case-control pilot study was conducted with 135 male and female volunteers, subdivided into 2 groups: Case Group, composed of 34 individuals with non-syndromic CLP; and Control group, consisting of 101 individuals without CLP. Saliva samples were collected in a 15 mL falcon tube properly identified, and genomic DNA was extracted using commercial kit. The analysis of polymorphic variants was done in duplicate in 384-well plates (including negative controls) using the *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (R-T PCR) technique and the TaqMan SNP genotyping assays. Comparisons between genotype and allele frequencies were performed using the Chi-square test with 95% confidence interval ($p < 0.05$). The studied population was tested and was in Hardy-Weinberg equilibrium. There was no statistically significant difference between the groups regarding the presence of the three polymorphisms studied, indicating that in this pilot study, variants rs243865, rs2285053 and rs2287074 in the *MMP-2* gene were not associated with the non-syndromic CLP phenotype. This result is corroborated by literature. However, because it is a pilot study, we consider that new investigations with a larger sample number are necessary to clarify the role of these variants in the *MMP-2* gene in the phenotype of non-syndromic cleft lip and palate.

Keywords: matrix metalloproteinases; *MMP-2*; polymorphism; oral clefts.

Financial support: CNPq and CAPES (001)

ANALYSIS AND COMPARISON OF TWO DIFFERENT DNA EXTRACTION PROTOCOLS FROM SALIVA SAMPLES STORED FOR LONG PERIODS

Pereira, Maria C.M.¹; Ramos, Natalia³; Queiroz, Thaís B.¹; Silva, Carolina M.¹; Santos, Carlos F.², Mateo-Castillo, Jose F.¹; Gonçalves, Andrea G. B.¹; Neves, Lucimara T.^{1,2}

¹Post-Graduation Program in Rehabilitation Sciences, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo (HRAC/USP). Bauru, São Paulo, Brazil.

²Bauru School of Dentistry. University of São Paulo. Department of Biological Sciences. Bauru/ São Paulo-Brazil.

³State University of Londrina, UEL

mcarolinapereira@usp.br

Among the samples used in genetic-molecular studies, saliva is being recognized as an alternative source for DNA isolation because it presents a simpler collection, without considerable risk, and mainly due to the lower risk of contamination. Unlike blood, there are hypotheses that saliva can be stored for a long period of time, allowing for the implementation of biorepository for storage of those samples, which require a relatively long period of storage between collection and processing to obtain DNA. This study aimed to compare two DNA extraction protocols for fresh and frozen saliva stored for 2 and 6 years, analyzing the quality, purity and viability through spectrophotometer analysis and genotyping assays. Five mL of fresh saliva were collected in a sterile falcon tube. Saliva samples stored for 2 and 6 years at -20 °C were obtained from other studies in the finishing phase. The collection and analysis were performed at the Laboratory of Pharmacology and Genetics of FOB/USP. DNA extractions from the 102 samples were performed using two DNA extraction protocols: Protocol 1 (acetate); and Protocol 2 (Colunas DNA Purification from Blood or Body Fluids, QIAamp®, Qiagen®). Then, the genomic DNA was subjected to spectrophotometric analysis (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific) and genotyping of the rs12532 polymorphism in the *MSX1* gene by means of *Real-Time Polymerase Chain Reaction (R-T PCR)* in the Viiia 7 (Life Technologies®, United States). In the spectrophotometric analysis low values of DNA concentrations were found, many of them below 10 ng/μL of DNA. In contrast, many samples had A260\280 ratios within the optimal standards accepted and used in several studies (between 1.6 and 2.0). The analysis of genotyping tests for protocol 1 and protocol 2, respectively, indicated that 76,47% and 88,23% of the samples stored for 6 years; 82,35% and 100% of the samples stored for 2 years; and 82,35% and 100% of the fresh saliva samples could be genotyped. Thus, from the results found it is possible to infer that saliva stored for up to 6 years proved to be appropriate for molecular studies, being an easily obtainable alternative. The results also showed that the samples stored for a period of 6 years may still be viable for R-T PCR, allowing for the genotypic characterization of polymorphisms in both protocols, with a slightly higher percentage of better use for protocol 2.

Keywords: DNA Extraction; PCR; Genotyping; Biorepository

Financial support: FAPESP (2014/24416-4); CAPES (001)

CYP3A4 POLYMORPHISM STUDY DERIVED OF SALIVA SAMPLES: PRELIMINARY RESULTS

Oliveira, Gabriela M¹; Weckwerth, Giovana M¹; Bolani, Bruna¹; Dionísio, Thiago J¹; Calvo, Adriana M¹; Santos; Carlos F¹; Faria, Flávio A. C¹.

¹Bauru School of Dentistry. University of São Paulo. Department of Biological Sciences. Bauru/ São Paulo-Brazil.

gab.moraes@usp.br

Drug prescription individualization, through pharmacogenetics, is increasingly becoming the focus of current research in pharmacology, making possible the minimization of drugs adverse effects. Possible relationship of CYP3A4 polymorphism, one of the principal metabolizers of lidocaine in its main metabolite, monoethyl-glycinexididide (MEGX), has been reported in the literature today. CYP3A4*1G (99763843 C>T; rs2242480) was described as the main factor for the expression of CYP3A4 protein for drug metabolism, inducing in homozygous mutated patients a decreased drug metabolism and an increased plasma concentration. Thus, this study aimed to triage and genotype 20 participants, that were in treatment at Clinical Pharmacology and Physiology Laboratory-USP/FOB, in order to find the link between possible CYP3A4 polymorphisms and lidocaine metabolism. Twenty saliva samples from participants were used for DNA extraction (DNA Extract all-Applied Biosystems®), then genetic sequencing (Illumina® MiSeq® System) was performed using the panel PGx2018.1.4.1, developed by Kailos Genetics® Inc, Alabama, USA. Were analyzed 87 genes correlated with drugs metabolism, among them CYP3A4 (rs2242480). The results showed that 50% of the participants were ancestral homozygous (CYP3A4*1/*1). The remaining 50% presented the allelic variants for CYP3A4*1G, 40% for the heterozygous variant (CYP3A4*1/*1G) and 10% for the mutated homozygous variant (CYP3A4*1G/*1G). These results will be used to evaluate the relationship of the CYP3A4 polymorphism in the metabolism of lidocaine in association with pharmacodynamic and pharmacokinetic parameters (PK / PD), which will be carried out in the next step of this research, through liquid chromatography with mass spectrometer (LC/MS).

Financial Support: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (2017/12725-0); (2018/04157-5).

Keywords: Lidocaine, CYP3A4, Genotyping.

GENETIC PREDISPOSITION IN NON-SYNDROMIC CLEFT LIP AND PALATE: PILOT STUDY OF POLYMORPHIC VARIANTS IN *MMP-3* GENE

Silva, Carolina M.¹, Olano-Dextre, Tulio L.¹, Queiroz, Thaís. B.¹, Pereira, Maria, C. M.¹, Mateo-Castillo, Jose F.¹, Gonçalves, Andréa. G. B.¹, Neves, Lucimara T.^{1,2}

¹Post-Graduation Program in Rehabilitation Sciences, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo (HRAC/USP). Bauru, São Paulo, Brazil.

²Department of Biological Sciences, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo; Post-Graduation Program in Rehabilitation Sciences, Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies, University of São Paulo (HRAC/USP). Bauru, São Paulo, Brazil.

carolinamaia@usp.br

Among the craniofacial malformations involving the face and oral cavity, the cleft lip and palate is the most common. This congenital anomaly occurs during the first weeks of intrauterine life and, in Brazil, affects 1 in 650 live births. This malformation presents a complex and multifactorial etiology, comprising genetic and environmental factors. The environmental factors reported are related to maternal habits during pregnancy. Among the genetic factors, some genes are considered candidates for this malformation, including matrix metalloproteinases (*MMPs*). One of the mentioned *MMPs* functions is that they participate in the complex craniofacial development, for that reason, it is believed that variants in this family of genes could have influence in the occurrence of cleft lip and palate. Therefore, the objective of this study was to investigate the frequency of polymorphic variants rs679620 and rs522616 in the *MMP-3* gene in subjects with non-syndromic cleft lip and palate, comparing frequencies in the control group without cleft. The study sample consisted of 34 individuals with non-syndromic cleft lip and palate (GI - cases) and 101 individuals without orofacial cleft (GII - control). Samples of 5 mL of saliva were collected from each participant and the samples were submitted to DNA extraction using a commercial kit. The rs679620 and rs522616 polymorphisms in the *MMP-3* gene were analyzed by the Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Comparisons between genotype frequencies were performed using the chi-square test (X^2), where values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. After the genotyping experiments it was verified that the group studied was in Hardy-Weinberg equilibrium. The results of groups I and II were compared for each of the polymorphic variants. As results, for the rs679620 polymorphism, in the comparison between GI and GII, no statistically significant differences were found. The same occurred for polymorphism rs522616, which also did not present significant differences between the groups. The results found were different from some data found in the literature, which reported a positive association between these polymorphisms and the cleft lip and palate. It was concluded that, of the polymorphic variants studied in this pilot study with a Brazilian population group, no positive association was found between these polymorphic variants and non-syndromic cleft palate. However, because it is a pilot study, other studies are needed to clarify the role of these polymorphisms or even other polymorphisms in the *MMP-3* gene in the etiology of non-syndromic cleft palate.

Keywords: non-syndromic cleft lip and palate, genetic factors, *MMP-3*, polymorphisms.

Financial Support: CAPES e CNPq.

FILOGENIA MOLECULAR PRÉVIA DE CALLICHTHYIDAE (OSTARIOPHYSI: SILURIFORMES) UTILIZANDO UCES

Dias, Angelica¹; Roxo, Fabio²; Oliveira, Claudio²

¹Aluna de doutorado do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP); ²Pesquisador da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Departamento de Morfologia – Instituto de Biociências, Unesp/Botucatu – End.: Rua Prof. Dr. Antônio C. W. Zanin, s/n°, Rubião Júnior s/n°, CEP 18618–689, Botucatu-SP, Brasil.

angelcdias@hotmail.com

Callichthyidae é uma das maiores famílias de Siluriformes, endêmica da região Neotropical, com mais de 220 espécies distribuídas em duas subfamílias: Callichthyinae (cinco gêneros e 18 espécies) e Corydoradinae (três gêneros e 202 espécies). A grande diversidade da família, somada às grandes mudanças em tamanho dos genomas, proporciona material abundante para estudos de questões fundamentais em evolução e ecologia. As relações filogenéticas da família vêm sendo alvo de vários estudos com base em caracteres morfológicos e moleculares. Entretanto, diversas questões ainda persistem, principalmente devido ao baixo número de táxons terminais e caracteres utilizados para formulação das árvores. Dessa forma o objetivo principal deste trabalho é analisar as relações filogenéticas e os processos evolutivos responsáveis pela grande diversidade de espécies da família Callichthyidae. Assim sendo, nós testamos a hipótese de monofiletismo da família, assim como o padrão de relacionamento entre os membros internos utilizando uma abordagem filogenômica de 2.500 Elementos Ultraconservados (UCEs) para cerca de 36 táxons até o momento, representando 6 gêneros da família. A topologia da árvore foi estimada através do método de Verossimilhança no programa RAxML, e posteriormente, foi estimado o tempo de divergência entre as linhagens utilizando o programa Beast v1.8.4. Todos os nós foram suportados com 100% de valores de *bootstrap*. Nossos resultados sugerem que Callichthyidae se originou há cerca de 94,4 milhões de anos (ma), a subfamília Callichthyinae há 23,7 ma e a subfamília Corydoradinae há 57,5 ma. Nossos resultados preliminares também sugerem o não monofiletismo de *Megalechis* divergindo de resultados encontrados na literatura, e o monofiletismo de *Corydoras* (incluindo o gênero *Brochis* identificado como *C. britskii* na árvore). Entretanto, essa topologia deverá ser alterada a medida que sejam inseridos mais táxons nas análises.

Palavras-chave: Corydoradinae, Callichthyinae, Genoma, Bayesiana, Verossimilhança

AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO 2-FENILBENZOTRIAZOL-9 NÃO CLORADO (NON-CI PBTA-9)

Tanamachi, Amanda R¹; Fernandes, Fábio H¹.; Vendemiatti, Josiane S.²; Prediger, Patrícia²; Umbuzeiro, Gisela A.²; Salvadori, Daisy M. F.¹

¹ Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina, Botucatu, São Paulo

² Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia, Limeira, São Paulo

amandatanamachi@gmail.com

A indústria têxtil promove grande impacto poluidor nos corpos pluviais, principalmente por meio de compostos utilizados na coloração de tecidos. Além disso, os métodos de tratamento de água e efluentes convencionais não são eficientes para a remoção desses compostos, pelo contrário, o processo de cloração pode tornar os azos corantes, ainda mais mutagênicos. Portanto, a poluição ambiental por essa classe de corantes, seus subprodutos e intermediários vêm sendo tema de inúmeros estudos para a caracterização química e toxicológica, sobretudo dos subprodutos e intermediários gerados, dentre os quais o grupo dos 2-fenilbenzotriazóis não clorado (*non-CI*/PBTA). Dentro desse grupo, o inédito *non-CI* PBTA-9 tem recebido maior destaque, pois é derivado do corante Disperse Violet 93 (DV93), o qual tem sido detectado frequentemente e em grande quantidade nos corpos fluviais brasileiros. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial genotóxico da exposição aguda ao subproduto *non-CI* PBTA-9 no sangue periférico de camundongos Swiss (*Mus musculus*). Assim, os animais foram distribuídos em 6 grupos (n= 10 cada): 1) Grupo controle negativo – tratados com água filtrada; 2) Grupo controle positivo: tratados com *n*-metil-*n*-nitrosurea (MNU, 50 mg/kg peso corpóreo – p.c.) via injeção intraperitoneal; 3) Grupo controle veículo: tratados com dimetilsulfóxido (DMSO; 0,5%) via oral (*gavage*); 4-6) expostos a três concentrações do *non-CI* PBTA-9, 5, 50 e 500 µg/kg p.c., definidas com base nas concentrações de DV93 detectadas nos rios, respectivamente. Todos os animais receberam água filtrada e dieta comercial *ad libitum*. Após 6 horas da exposição, foram coletados, da veia facial, 20µL de sangue periférico para realização do ensaio do cometa e foram analisados 150 nucleoides/animal (% *tail intensity*). Os dados foram analisados pelo teste estatístico modelo linear com distribuição gama. Nas condições experimentais, foi detectado aumento de danos primários ao DNA na maior concentração testada, o grupo 500 µg/kg de *non-CI* PBTA-9 (p< 0,05). Em conclusão, mesmo em concentrações muito baixas, o *non-CI*-PBTA-9, um subproduto do corante azo DV93, foi genotóxico após exposição aguda, sugerindo que a contaminação da água com esses compostos pode ser prejudicial ao meio ambiente e à saúde humana. No entanto, outros *endpoints* e tecidos precisam ser investigados para garantir a exposição segura a esse subproduto.

Palavras-chaves: poluição aquática, corantes azo, Disperse Violet 93, *non-CI* PBTA-9, genética toxicológica.

Agências de fomento: FAPESP (2018/04105-5) e CNPq

ASSESSING THE 1000 GENOMES DATA CONSISTENCY AT *KIR2DL4* POLYMORPHISM

Weiss, Emiliana^{1,2}, Andrade, Heloisa S.^{1,2}, Castelli, Erick C.^{1,2,4}

(1) Molecular Genetics and Bioinformatics Laboratory, Experimental Research Unity, School of Medicine - UNESP, Botucatu – SP, Brazil (2) Graduate Program on Biological Sciences (Genetics), Bioscience's Institute of Botucatu, UNESP – São Paulo State University, Brazil (4) Graduate Program on Pathology, School of Medicine of Botucatu, UNESP – São Paulo State University, Brazil;

emiliana.weiss@gmail.com

The 1000 Genomes Project described the human genome variability from worldwide population samples using next-generation sequencing (NGS) and high density SNP-array. The 1000G data is publicly available and has been used so far in more than 2000 articles and is composed by 26 different populations. However, some studies have reported that the 1000G data is not suitable for highly polymorphic and/or repetitive genomic regions, mainly genes involved in the regulation of immune responses such the KIR genes. Considering that (a) most of the NGS procedures are related to short sequence reads, (b) KIR genes are the most variable genes of the human genome, and (c) they present sequence similarities, a great read mapping bias is expected. This mapping bias may lead to the underestimation of HLA variability at some segments, and also the overestimation of reference allele frequencies. Thus, for KIR genes, it is mandatory the use of specific mapping tools with the ability to deal with such polymorphic and repetitive sequences. To address this issue, and also to evaluate the accuracy of the 1000G data regarding the *KIR2DL4* gene genotypes, we downloaded the .vcf file present in the 1000G dataset and compared the number of SNPs with the results found in a Brazilian population sample. 261 variable sites were detected in 2.504 individual present in the 1000G. Of those, only 55 variable sites were also found in the Brazilian population sample composed of 157 individuals. We performed an analysis of the SNP (rs11371265) present in exon 6 of the *KIR2DL4*. This SNP is a deletion of an Adenine, and it leads to a frameshift, causing a truncated protein, which the function is unclear. In the Brazilian population sample, we found 50% of frequency of this SNP, which corresponds to the same described in the literature. For our surprise, all individual described in the 1000G have the deletion of this Adenine. This result is quite questionable, once the literature describe that different population have different frequency of this deletion. Thus, although the 1000G Project provides a foundation for the study of human genetics and variability, its data regarding the *KIR* genes family members should be used with caution, since wrong genotypes and haplotypes may lead to biased inferences.

Funding Agency: FAPESP/Brazil 2017/19223-0.

Key-words: NSG; *KIR2DL4*; Polymorphism; 1000 Genome.

DESCRIÇÃO CITOGENÉTICA DE *Megaleporinus brinco* (BIRINDELLI, BRITSKI & GARAVELLO, 2013) (Characiformes, Anostomidae) DO RIO SANTO ANTÔNIO, ITAGI- BA

Luís Ricardo Ribeiro da Silva²; Edval A. Sobrinho¹; Vicari Marcelo, R.³; Affonso Paulo R. A. M. ¹
Débora Diniz¹

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 45208-091, Jequié, BA, Brazil. E-mail: debora.dinizb@gmail.com. ²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP-Botucatu. ³Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Atualmente, Anostomidae agrega 156 espécies, distribuídas em diferentes bacias hidrográficas sul-americanas e agrupadas em 15 gêneros. Recentemente, *Megaleporinus* Ramirez, Birindelli & Galetti, 2017 foi descrito com base em dados citogenéticos, moleculares e morfológicos, incluindo 10 espécies, anteriormente designadas como *Leporinus* Agassiz, 1829 e *Hypomasticus* Borodin, 1929. Do ponto de vista citogenético, *Megaleporinus* abrange as espécies que possuem cromossomos sexuais heteromórficos. Dentre esses três gêneros, apenas *Megaleporinus* apresenta espécies com sistema de cromossomos sexuais diferenciados do tipo ZZ/ZW. O objetivo desse trabalho foi descrever cariotipicamente a espécie endêmica *M. brinco* por meio de técnicas de citogenética clássica e molecular. As coletas foram realizadas no rio Santo Antônio, no município de Itagi, Bahia, pertencente à bacia do Rio de Contas. Os exemplares coletados foram submetidos aos procedimentos citogenéticos convencionais (Giemsa, bandamento C e Ag-RONs), aliados à citogenética molecular (hibridação *in situ* fluorescente com sondas de DNA ribossômico 18S e 5S). O número diplóide encontrado foi $2n = 54$ cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (NF=108), com a presença de sistema de cromossomos sexuais tipo ZZ/ZW. O cromossomo W é quase inteiramente heterocromático, enquanto o cromossomo Z apresenta heterocromatina apenas na região terminal. Nos autossomos, foram evidenciados blocos heterocromáticos restritos à região pericentromérica. A FISH com sondas de rDNA 18S revelou marcação nas regiões terminais de um único par cromossômico com heteromorfismo de tamanho. O rDNA 5S também foi observado na posição terminal de apenas um par de cromossomos. Estes dados corroboram tanto o conservadorismo da macroestrutura cromossômica na família, quanto a aparente presença de cromossomos sexuais em *Megaleporinus*.

Palavras-chave: Atlântico Leste, Citotaxonomia, Cromossomos Sexuais, Endemismo, Ictiofauna.

Agências financiadoras: FAPESB- Projeto redes 0009/2013.

ANÁLISE DOS SNPs (rs1801131 e rs1801133) DO GENE MTHFR UTILIZANDO O BANCO DE DADOS 1000 GENOMES

Andrade, Heloísa S.^{1,2}; Weiss, Emiliana^{1,2}; Passos, Marília R. S.^{1,3}; Almeida, Bibiana S.⁴

¹ Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, Unidade de Pesquisa Experimental, Faculdade de Medicina – UNESP, Botucatu – SP, Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Brasil;

³ Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Brasil;

⁴ Universidade Federal de Santa Catarina

heloandrade96@gmail.com

O gene MTHFR está localizado no cromossomo 1 em humanos. Ele possui grande importância em diversas vias metabólicas em nosso organismo. MTHFR codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase, a qual participa no metabolismo do folato e da metionina e é imprescindível na síntese de purinas e na metilação do DNA. É uma das enzimas inibidas pelo imunossupressor metotrexato (MTX) que é utilizado no tratamento de doenças crônicas como Artrite Reumatoide e Lúpus Eritromatoso Sistêmico. Além disso, polimorfismos encontrados nesse gene estão associados a diferentes distúrbios, como: deficiência de vitamina B12, defeitos no tubo neural, anencefalia, trombose, entre outras. Um dos objetivos do presente projeto é averiguar o polimorfismo da posição 677 (rs1801133) e 1298 (rs1801131). Esses polimorfismos vêm sendo associados a genótipos de risco para o aumento de efeitos colaterais do fármaco metotrexato, que é ofertado nos SUS para o tratamento de doenças como câncer e autoimunes. Para isso, foi determinada a frequência dos SNPs rs1801133 (C>T) e rs1801131 (A>C) presentes no banco de dados do projeto *1000Genomes*. Os indivíduos foram divididos em cinco grupos conforme sua ancestralidade (Africano, Ameríndio, Europeu, Leste e Oeste Asiático), e o *arquivo .vcf* contendo os genótipos do segmento 1:11854476-11856378 (hg37) foi baixado diretamente do site do *1000Genomes*. Utilizamos os *softwares* VCFtools e VCFX para calcular a frequência alélica dos SNPs, além disso a frequência genotípica e HWE foram calculados para a população geral e para cada um dos subgrupos. Analisando a frequência dos SNPs em cada população, observamos uma frequência elevada do alelo alternativo nas populações europeias (31%) e do oeste asiático (41%) em relação ao SNP rs1801133, por outro lado, há uma frequência maior que 80% para a referência nas populações africana e ameríndia. Já para o SNP rs1801131 observamos uma frequência maior que 35% nas populações europeia (36%) e ameríndia (47%) para o alelo alternativo, enquanto a africana e do oeste asiático possuem uma frequência de 90% para a referência. Todas as populações estão sobre o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esta diferença expressiva nos diferentes subgrupos com relação a polimorfismos presentes em um gene essencial, mostra que analisar a ancestralidade dos indivíduos em um estudo de associação é de extrema importância, pois ela nos oferece mais informações para compreender a doença em estudo, sua distribuição e frequência. E além disso, esse tipo de análise fornece informação sobre medicamentos que não deveriam ser indicados para populações com predominância de uma determinada ancestralidade.

Palavras-chave: 1000 Genomes, SNPs, MTHFR, ancestralidade.

VISUALIZAÇÃO DOS DADOS DE EXPRESSÃO DE PULMÃO INTEGRADA A REDE DA VIA DE SINALIZAÇÃO NSCLC UTILIZANDO O PACOTE LEVI PARA AMBIENTE R.

Pilan, José R.¹; Takeda, Agnes, A.S.¹; Rybarczyk-Filho, José, L¹.

¹Dep. de Física e Biofísica, IBB, UNESP, SP.

rafael.pilan@unesp.br

Atualmente os pesquisadores tem a sua disposição uma gama de tecnologias para obtenção de dados biológicos, tais como: microarranjo de cDNA, espectrometria de massa, RNA-seq, *Single Cell sequency*, etc. Cada uma destas tecnologias propicia o desenvolvimento de metodologias específicas para a análise de dados gerados. Entretanto existe uma defasagem nas metodologias que consigam integrar os dados de diferentes tecnologias tanto de forma qualitativa quanto quantitativa. Neste trabalho apresentamos uma aplicação da ferramenta Levi (*Landscape Expression Visualization Interface*) desenvolvida para o ambiente computacional R permitindo, com isso, ser executado em uma variedade de sistemas operacionais como as plataformas Unix, Windows e MacOS. O Levi está disponível para *download* na plataforma Bioconductor.org que é o maior repositório internacional de ferramentas para ambiente R aplicado em estudos de Bioinformática. Levi integra dados de redes biológicas e transcriptomas/Funções Biológicas e os apresenta na forma de um *heatmap* para evidenciar as regiões com diferentes níveis de expressão. A ferramenta foi desenvolvida com o foco em dois modos distintos de visualização: Interface de usuário (GUI) e script. O modo GUI foi implementado utilizando o pacote Shiny e se destina principalmente aos usuários com qualquer nível de conhecimento em informática por possuir elementos gráficos como botões e barras de rolagem que tornam sua utilização mais intuitiva. O modo script utiliza linhas de comando no terminal do próprio ambiente R e permite a execução em lote para a criação de gráficos com diferentes comparações entre tecidos. Construímos a rede de interação da sinalização *Non-Small Cell Lung Cancer* (NSCLC) (map05223) utilizando os dados do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e STRING *database* (v11.0) *database* com os parâmetros: *Experiments*, *Databases* e *confidence score* de 0.400 (*medium score*). A rede criada possui 55 proteínas e 279 interações. Utilizamos o Levi para avaliar a expressão de câncer de pulmão de indivíduos fumantes, ex-fumantes e não fumantes obtidos no *Gene Expression Omnibus* (GSE10072). Analisamos os *heatmaps* obtidos a partir das comparações entre as amostras de câncer de pulmão com as amostras sem tumor (não-fumantes). Os resultados indicaram que os genes STAT3 e FOXO3 estão com expressão positivas nas amostras sem tumor, enquanto nas amostras de câncer de pulmão o gene apresentou menores níveis de expressão. A amostra de câncer revelou a regulação positiva dos genes E2F2, STAT5B, CDK4 e GADD45A. Esses genes também estão superexpressos em outros estudos existentes na literatura de indivíduos com adenocarcinoma pulmonar, o que corrobora com os resultados obtidos.

Palavras-chave: Expressão gênica, Redes Biológicas, Sequenciamento, R.

Financiamento: CNPq

GENETIC DIVERSITY ASSESSMENT OF BRAZILIAN POPULATIONS OF *Triatoma sordida* (STÅL, 1859), BY MITOCHONDRIAL ND1 GENE

Madeira, Fernanda F.¹, Alevi, Kaio C. C.², Bittinelli, Isadora F.¹, Delgado, Luiza M. G.¹, Oliveira, Jader², Rosa, João A.², Azeredo-Oliveira, Maria Tercília V.¹.

¹ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP - São José do Rio Preto, SP.

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCFAR/UNESP - Araraquara, SP.

fernanda.bio56@hotmail.com

Triatoma sordida (Stål, 1859) has been reported in 14 Brazilian states and is currently the Chagas' disease vector most frequently captured in the peridomestic environment in Brazil, including it among the priorities for the country's triatomine control campaigns. Several aspects should be taken into account for the planning and execution of effective control protocols against triatomines, such as the population structure of these hematophagous insects, with mitochondrial DNA (mtDNA) sequencing being considered as methods that provide the most accurate information about the genetic characteristics of these vectors. In this context, the need arises to carry out a genetic study in population scope among its specimens from different Brazilian states. So, the objective of the present study was to characterize, through the mitochondrial molecular marker ND1, population variants of *T. sordida* specie that occur in Brazil, in order to infer their genetic diversity. At least three specimens from the following Brazilian locations were analyzed: Brasília de Minas – MG, Catuti – MG, Corumbá – MS, Macaúbas – BA, Porteirinha – MG, Posse – GO, Riacho dos Machados – MG, Santo Inácio – PA and Tanhaçu – BA. Genomic DNA was extracted from the legs of adult specimens. The amplification of the fragments was done by means of Polymerase Chain Reaction (PCR), using mitochondrial ND1 gene primers described in the literature. The amplification products were visualized by 1% agarose gel electrophoresis, purified by the GFX Purification Kit (GE Healthcare) and sent for sequencing (USP-SP). A sequence of the species *T. infestans* was used as outgroup. Editing and multiple alignment of the sequences was done in BioEdit 7.0.5.3 software. Genetic distance analyzes among populations were estimated by the MEGA 7.0 program, using the Kimura-2 parameters model. A low genetic diversity was observed among all analyzed populations, with values found between 0 and 2.1%. The distance between all locations with the outgroup was approximately 9.2 to 10.6%. These results corroborate and expand the extremely low genetic diversity already verified by cytogenetic and molecular tools of *T. sordida* populations in Brazil. Thus, it is suggested that the genetic drift directly affected the expansion of the Brazilian populations of *T. sordida*, either by the founder effect from a smaller ancestral population, or by the bottleneck effect from the chemical control of these vectors with pyrethroid insecticides. In addition, our results demonstrate that the Brazilian specimens of *T. sordida* are not suffering from cryptic speciation, a phenomenon already reported for *T. sordida* from Argentina and Bolivia.

Key words: population genetics, triatomines, Chagas' disease.

Financial support: FAPESP (Process nº 2017/05015-7), CAPES and CNPq.

CYTOGENETIC ANALYSIS OF SPERMATOGENESIS OF *Triatoma infestans* INFECTED WITH *Trypanosoma cruzi*

Oliveira, Ana Beatriz B.¹, Alevi, Kaio C. C.², Tedeschi, Bianca B. B.¹, Oliveira, Jader², Rosa, João A.², Madeira, Fernanda F.¹, Azeredo-Oliveira, Maria Tercília V.¹

¹ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP - São José do Rio Preto, SP.

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCFAR/UNESP - Araraquara, SP.

anabbortolozo@gmail.com

Chagas disease, a neglected illness caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects about eight million people and puts at risk of infection another 25 million worldwide. The main form of transmission of this parasite is the vectorial, through the feces of blood-sucking insects called triatomines. However, the relationship between these organisms is still poorly understood, being the deepening of knowledge about host-parasite relationship a important tool for strategic directions of new epidemiological approaches. From the reproductive point of view, it was suggested that the parasite presence may be related to losses in the reproductive performance of these vectors. In this context, the aim of this study was to evaluate the influence of *T. cruzi* in *Triatoma infestans* spermatogenesis. For that, five male adults of *T. infestans* were infected with the Bolivia strain of the protozoan, through hematophagy in contaminated rats. Five days after infection, the insects were dissected and the testicles were removed and used for mounting of slides by cellular crushing. Posteriorly, the slides were stained with the lacto-acetic orcein cytogenetic technique and analyzed by light microscope. The analyzes allowed to observe that *T. cruzi* did not affect the *T. infestans* spermatogenesis, since all phases of this process (spermatocytogenesis, meiosis and spermiogenesis) occurred normally. It was suggested that *T. rangeli* infection decreases nutritional reserves of triatomines, affecting fecundity and fertility of these insects, besides possibly harming the oogenesis of this organisms by triggering decrease of the lipid incorporation in the oocytes. Thus, based on that reported for *T. rangeli* and in the absence of the influence of *T. cruzi* infection in *T. infestans* spermatogenesis, we suggest that reproductive changes associated with the presence of this parasite previously described in other studies for Triatominae are due to influence of the *T. cruzi* only in the female gametogenesis.

Key words: Chagas disease, parasite-vector interaction, Triatominae.

Financial support: CAPES and CNPq.

MITOCHONDRIAL GENE CYTOCHROME B CONFIRMS EVENT OF CRYPTIC SPECIATION IN *Triatoma sordida* (STÅL, 1859) (HEMIPTERA, TRIATOMINAE)

Alevi, Kaio C. C.¹, Fernanda F. Madeira², Isadora F. Bittinelli^{1,2}, Luiza M. G. Delgado², Jader Oliveira¹, Maria T. V. Azeredo-Oliveira², Rosa, João A.¹

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCFAR/UNESP - Araraquara, SP.

² Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP - São José do Rio Preto, SP.

kaio.chaboli@unesp.br

Triatoma sordida (Stål, 1859) is the triatomine most frequently captured in peridomicillary environment in Brazil, which highlights its vectorial importance in the transmission of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), the etiologic agent of Chagas' disease. In addition to its wide geographical distribution in Brazil, this species was reported in Argentina, Bolivia, Paraguay and Uruguay. Chromosomal data point to a possible event of cryptic speciation in *T. sordida*, which resulted in the proposal of three cytotypes, namely *T. sordida sensu stricto*, *T. sordida La Paz* and *T. sordida Argentina*. Based on this, we molecularly characterized the three cytotypes by means of the mitochondrial gene cytochrome b (cyt b) and evaluated the intraspecific genetic distance of these vectors. Three specimens from the following localities were analyzed: *T. sordida sensu stricto* from Corumbá/Mato Grosso do Sul (Brazil) and Santa Cruz (Bolivia), *T. sordida La Paz* from La Paz (Bolivia) and *T. sordida Argentina* from Corrientes (Argentina). Genomic DNA was extracted from the legs of adult specimens using the DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN). The amplification of the fragments was done by means of Polymerase Chain Reaction (PCR), using mitochondrial cyt b gene primers described in the literature. The amplification products were visualized by 1% agarose gel electrophoresis, purified by the GFX Purification Kit (GE Healthcare) and sent for sequencing (USP-SP). Editing and multiple alignment of the sequences was done manually in BioEdit 7.0.5.3 software. Genetic distance analyzes among populations were estimated by the MEGA 7.0 program, using the Kimura-2 parameters model. *T. sordida Argentina* presented high genetic distances when compared to *T. sordida sensu stricto* (8.7% and 8.2% for insects from Bolivia and Brazil, respectively) and *T. sordida La Paz* (8.7%). The triatomines of Bolivia grouped in the cytotypes *T. sordida sensu stricto* and *T. sordida La Paz* present 0% of genetic distance and the specimens of *T. sordida sensu stricto* from Brazil and Bolivia presented 0.7% of genetic distance. Taking into account that genetic distances greater than 2% signal speciation, our results confirm that *T. sordida Argentina* represents a new taxon and discard the possibility of *T. sordida La Paz* to represent a new species, highlighting that the chromosomal polymorphisms initially observed between *T. sordida La Paz* and *T. sordida sensu stricto* represent only intraspecific variation.

Key words: genetic distance, taxonomy, Chagas disease vectors.

Financial support: FAPESP (Processo nº 2017/05015-7), CAPES and CNPq.

**COMÉRCIO IRRESPONSÁVEL DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS EM SERRASALMÍDEOS:
UMA AMEAÇA AOS RECURSOS PESQUEIROS NACIONAIS**

Martins, Diego G.¹; Mourão, Andrea A.F.¹; Prado, Fernanda D.¹; Hashimoto, Diogo T.²; Foresti, Fausto³; Junior, Carlos E.R.⁴; Foresti, Fabio P.¹

¹Universidade Estadual Paulista (Bauru), Departamento de Ciências Biológicas.

²Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal), Centro de Aquicultura da UNESP.

³Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu-SP.

⁴Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Com o crescimento da aquicultura, a hibridação interespecífica se popularizou entre os sistemas de produção intensiva de peixes. Apesar das vantagens zootécnicas proporcionadas pela metodologia, ela pode representar uma forte ameaça para os estoques cultivados e populações selvagens, através da introgressão genética, que pode ser responsável pela perda de características de interesse para a produção, aumento nas taxas de mortalidade e redução na viabilidade das proles geradas. No ambiente, os efeitos da introgressão podem alterar a composição genética de populações selvagens, extinguindo-as geneticamente. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo ampliar as informações acerca da cadeia produtiva de serrasalmídeos no país. Para isso, 364 amostras comerciais das espécies *Piaractus mesopotamicus*, *Piaractus brachypomus* e *Colossoma macropomum*, que são consideradas as espécies nativas mais produzidas em sistemas de cultivo nacionais, foram identificadas através dos marcadores moleculares α -tropomiosina (TROP), apolipoproteína C-I (APOC), inibidor anti-enzima (AZIN) e Citocromo b (CYTB), a fim de identificar a ocorrência de exemplares híbridos. O diagnóstico molecular indicou um alto grau de substituição de mercadorias quando estes dados da identificação genética foram confrontados às nomenclaturas comerciais vinculadas aos espécimes, atingindo a frequência de 75,9% de amostras erroneamente comercializadas. Também foi notada a elevada ocorrência de exemplares híbridos, que corresponderam a 76,9% dos indivíduos analisados, destes, 67% foram considerados híbridos avançados e 33% híbridos F1. Este resultado se mostra extremamente relevante quando consideramos que os potenciais impactos da introgressão genética, nos cultivos, ou no ambiente, acabam colocando em risco toda a produtividade aquícola, pois os projetos de melhoramento genético, assim como a manutenção de matrizes reprodutoras em sistemas produtivos dependem da conservação das linhagens selvagens. Com isso, o trabalho chama a atenção para a necessidade de alterações na atual forma de produção e comércio de peixes redondos no país, comprometendo-se com a sustentabilidade da indústria aquícola.

Palavras-chave: Aquicultura, conservação biológica, marcadores moleculares.

ANÁLISE DA ESTRUTURA POPULACIONAL E DIVERSIDADE GENÉTICA DO TUBARÃO-MAKO (*Isurus paucus*) NO OCEANO ATLÂNTICO.

Magalhães, Carolina O.¹; Oliveira, Claudio³; Foresti, Fausto³; Ferrette, Bruno L.S.² e Mendonça, Fernando F.²

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Bauru, SP

² Instituto do Mar, Universidade Federal Paulista, Baixada Santista, SP

³ Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP

Isurus paucus, é um tubarão tropical oceânico amplamente distribuído, mas só ocasionalmente encontrado. É pescado principalmente como captura acessória na pesca de espinhel pelágica, mas em proporções muito mais baixas do que sua congênere, *I. oxyrinchus*. Suas capturas são inadequadamente monitoradas e possivelmente subestimadas devido a erros de identificação entre espécies do gênero *Isurus*. Esta espécie possui status preocupante de conservação, devido à sua aparente raridade e características biológicas, como: alta longevidade, crescimento lento, maturidade sexual tardia e baixa fecundidade, sendo atualmente listado como "Vulnerável" na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e Recursos Naturais (IUCN). No presente estudo, analisamos 823 pares de bases da região controle mitocondrial sequenciados de 113 indivíduos, coletados na região equatorial do Oceano Atlântico. Foram identificados 11 haplótipos, sendo um deles compartilhado por 38,05% dos indivíduos. A diversidade haplotípica e nucleotídica apresentaram valores baixos, respectivamente $h=0.761 \pm 0.023$ e $\pi=0.00247 \pm 0.00016$ e a análise AMOVA (análise de variância molecular) revelou a ausência de estruturação genética ($\Phi_{ST} = -0.00823$). Através dessas análises, é possível concluir que a espécie compõe uma única unidade populacional, na região amostrada. Para verificar os processos históricos evolutivos foram realizados os testes de neutralidade e a análise de distribuição demográfica *Mismatch*, que evidenciaram expansão populacional da espécie. Tais características genéticas podem ser explicadas pela alta capacidade migratória da espécie e pela ausência de barreiras ao fluxo gênico na região amostrada. Apesar das populações de *I. paucus* descritas no presente estudo possuírem alto grau de conectividade e índices de diversidade genética de uma população panmítica, a manutenção da variabilidade genética não deve ser ignorada, pois sua perda pode levar à endogamia e perda do sucesso reprodutivo. Nossos resultados descrevem o primeiro cenário de variabilidade genética para *I. paucus*, em uma importante área de sua distribuição no Oceano Atlântico, portanto, ressaltam a importância de mais estratégias efetivas de o manejo e conservação da espécie, que exijam colaboração internacional.

Palavras-chave: Dloop, Genética Animal, Pesca Ilegal, Conservação.

Apoio: CNPq, FAPESP.

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE TUBARÃO COMERCIALIZADAS NA COMPANHIA DE ENTREPÓSITOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO (CEAGESP)

Daneluz, Cahique M.¹, Oliveira, Raul B. C.¹, da Silva, Caio F.¹, do Prado, Fernanda D.¹, Porto-Foresti, Fábio¹

¹Universidade Estadual Paulista (Bauru), Departamento de Ciências Biológicas.

cah1que@hotmail.com

A sobrepesca é um dos principais fatores que explicam a diminuição das populações de tubarão nos oceanos, essa queda pode acarretar diversos problemas econômicos e ambientais para as populações costeiras e todo o ecossistema marinho, junto a sobrepesca a baixa fiscalização do que é pescado e a falta de informação dos vendedores e consumidores faz com que seja difícil desenvolver leis que regulamentem a nível de espécie a venda de produtos oriundos da pesca de tubarão. Visando tal problemática, o objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies de tubarão comercializadas e checar o seu estado de conservação através dos bancos de dados IUCN *Red List* e CITES. Para realizar as análises, foram feitas coletas na feira do pescado do CEAGESP. As amostras foram preservadas em álcool 100% e posteriormente levadas ao LAGENPE – Laboratório de Genética de Peixes da UNESP de Bauru para análise. Após o processo de extração de DNA e PCR (*Polymerase Chain Reaction*) do gene COI (*cytochrome c oxidase subunit I*) as amostras foram sequenciadas e o resultado foi comparado em dois bancos de dados online, BLAST e BOLD systems, para maior confiabilidade. Parte das amostras foi identificada como *Prionace glauca* (tubarão azul) e parte como *Squalus cubensis* (cação bagre), classificados como NT (*Near threatened*) e DD (*Data deficiente*) pela IUCN, respectivamente, tais indivíduos não apresentaram correspondência na CITES. A falta de dados acerca da espécie *Squalus cubensis* é preocupante porque pode subestimar dados de captura e assim não representar o real status populacional, nem mesmo a pressão de pesca ao qual a espécie está submetida. Apesar da espécie *Prionace glauca* não possuir status de conservação preocupante, é altamente explorada globalmente e são as capturas acessórias mais frequentes de espadarte e atum, além da pesca recreativa em todo o mundo. Portanto é ideal que sejam desenvolvidos programas de controle pesqueiro e um aumento nos esforços de avaliação dos estoques, para que a as taxas de sobrepesca não aumentem.

Apoio: IBAMA, ICMBio, UNESP.

USO DA TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MOLECULARES EM ESTUDOS GENÉTICO-POPULACIONAIS ENTRE ESPÉCIES DE GÊNERO *Leporinus*

Silva, Caio F.¹, Bruna B. Mendonça¹, Fernanda D. do Prado¹, Fabio Porto-Foresti¹

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu.

caio_nardo@hotmail.com

Os peixes estão entre o grupo mais diversos dentre os vertebrados. *Leporinus friderici*, popularmente conhecido como piaú três pintas, é uma espécie migradora que apresenta uma ampla distribuição na América do Sul. É caracterizada por apresentar três manchas escuras de forma arredondada e ovalada sobre o corpo, ao nível da linha lateral. Esta espécie possui grande importância na pesca comercial, artesanal e de subsistência. A escassez de microssatélites disponíveis na literatura para esta espécie faz da transferibilidade uma alternativa de baixo custo para o estudo genético populacional. O objetivo do presente estudo foi testar a amplificação cruzada de marcadores microssatélites para *L. friderici* de *loci* microssatélites desenvolvidos originalmente para *Megaleporinus obtusidens*, auxiliando futuros estudos genéticos. Foram coletados indivíduos de populações naturais de *L. friderici* no rio Sapucaí-Mirim, tributário da bacia Alto Paraná, localizado a noroeste do estado de São Paulo, Brasil. Foi feita a extração e purificação do DNA genômico por meio do uso de kit comercial. A verificação da sua qualidade e integridade se deu através de um gel de agarose 1%. Para os testes de amplificação cruzada dos *primers* foram aplicados 15 *loci* de regiões microssatélites desenvolvidos originalmente para espécie *M. obtusidens*. O DNA de cada indivíduo foi amplificado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,5%. Dos 15 *loci* aplicados, a maior parte amplificou com sucesso para a *L. friderici*. O alto nível de transferibilidade pode ser justificado pela proximidade evolutiva entre as duas espécies. Muitos trabalhos mostram que a amplificação cruzada de *loci* microssatélites podem ser extremamente alta quando realizadas em espécies do mesmo gênero, como para *Pseudoplatystoma reticulatum* em que foram amplificados satisfatoriamente *loci* descritos para *Pseudoplatystoma corruscans*. A transferibilidade dos *loci* microssatélites foi bem sucedida, mostrando-se uma alternativa para a ampliação do número destes marcadores em estudos genético-populacionais, uma vez que não há muitos disponíveis.

Palavras-chave: Transferibilidade. Marcadores moleculares. Microssatélites.

Apoio: UNESP, CNPq, FUNEP, CTG-Brasil.

THE COMET ASSAY IN *Ceraeochrysa claveri*: A SUITABLE APPROACH TO ASSESS DNA DAMAGE IN A PREDATOR INSECT

Gastelbondo-Pastrana, Bertha I.^{1*}, Scudeler, Elton L.¹, Fernandes, Fábio H.², Salvadori, Daisy M. F.², Dos Santos, Daniela C.²

¹Laboratory of Insects, Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP—São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

²Toxicogenomics and Nutrigenomics Laboratory, Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP—São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

*gastelbondo.pastrana@unesp.br

Some pesticides or biopesticides are genotoxic to several organisms. Nevertheless, few protocols are currently available in the literature to measure the toxicogenetic effects of these compounds in target and non-target species of insects important to agriculture. In the present study, we used the *Ceraeochrysa claveri*, an important non-target predator insect, to investigate the ability of an azadirachtin-based biopesticide (Azamax™) to induce DNA damage. The comet assay in somatic (gut) and germ cells (ovary) of *C. claveri* was standardized to measure the genetic instability caused by the toxicant. *C. claveri* larvae were distributed in 3 groups (10 larvae by group) and treated with Azamax™ at 0, 0.3 and 0.5 % during all the larval stage to evaluate the genetic consequences to insect adulthood (15 days). The results obtained by the alkaline version of the comet assay indicated that both doses of Azamax™ (0.3 and 0.5 %) were able to significantly ($p < 0.05$) increase primary DNA damage in ovary and gut cells of *C. claveri*. In conclusion, besides to demonstrate the genotoxic potential of Azamax™, the present study established the comet assay as a potential biomonitoring tool for investigating the genotoxic potential of environmental contaminants, especially those found in the agriculture environment.

Keywords: environmental mutagenesis, genotoxicity, insects, pesticide

Financial support: COLCIENCIAS (Colombia).

MOLECULAR PHYLOGENY CONFIRMS THE MONOPHYLY OF THE *Triatoma vitticeps* SUBCOMPLEX (HEMIPTERA, TRIATOMINAE)

Sousa, Paulo S.¹, Fernanda F. Madeira², Alevi, Kaio C. C.^{1,3}

¹ Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBB/UNESP - Botucatu, SP.

² Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP - São José do Rio Preto, SP.

³ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCFAR/UNESP - Araraquara, SP.

pssousa@prof.educacao.sp.gov.br

Based on morphological data and geographic distribution, the triatomines were grouped into eight complexes and eight specific subcomplexes. The *Triatoma infestans* complex groups mainly the Chagas disease vectors of the *Triatoma* genus present in South America. *T. melanocephala* and *T. vitticeps* were initially grouped in the *T. brasiliensis* subcomplex. However, cariosystematic analysis showed that both species should not be part of this subcomplex, which led to the creation of a new subcomplex called *T. vitticeps*. Based on that, we molecularly characterized the species of the subcomplex *T. vitticeps* (*T. melanocephala* and *T. vitticeps*) and of the subcomplex *T. brasiliensis* (*T. brasiliensis*, *T. b. macromelanosoma*, *T. bahiensis*, *T. juazeirensis*, *T. lenti*, *T. melanica*, *T. petrocchia* and *T. sherlocki*), using mitochondrial and nuclear markers and evaluated the phylogenetic position of *T. vitticeps* subcomplex species. Three specimens of each species of the subcomplexes *T. vitticeps* and *T. brasiliensis* from the “Insetário de Triatominae” at Araraquara were analyzed. As outgroup were used *Panstrongylus* spp. Genomic DNA was extracted from the legs of adult specimens using the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN). The amplification of the fragments was done through Polymerase Chain Reaction (PCR), using primers of the 16S, 28S, COI, Cyt B and ITS-1 genes described in the literature. The amplification products were visualized by 1% agarose gel electrophoresis, purified by the GFX Purification Kit (GE Healthcare) and sent for sequencing (USP-SP). Editing and multiple alignment of the sequences was done manually in BioEdit 7.0.5.3 software with the ClustalW tool. Subsequently, the sequences were concatenated through the Seaview 4 program and the concatenated alignment was submitted to the jModeltest program to evaluate the best model of nucleotide substitution. According to the Akaike information criterion (AIC) score, the best model was GTR+I+G, which was used in the Bayesian Inference analysis. The phylogenetic reconstruction rescued two monophyletic clades, one consisting of the *T. vitticeps* subcomplex and the other formed by the species of the *T. brasiliensis* subcomplex, confirming the exclusion of *T. melanocephala* and *T. vitticeps* from the subcomplex *T. brasiliensis* and, above all, corroborating the creation of the *T. vitticeps* subcomplex that satisfies the concept of subcomplex, because although this grouping is not recognized by the International Code of Zoological Nomenclature, it must necessarily form a natural group, that is, to be monophyletic.

Key words: genetic distance, taxonomy, Chagas disease vectors.

Financial Support: FAPESP (Processo nº 2017/05015-7), CAPES and CNPq.

HISTONE DEACETYLASES AS BIOMARKERS IN COLON ADENOCARCINOMA: A PILOT STUDY BASED ON THE CANCER GENOMA ATLAS (TCGA) DATABASE

Callegari, Diogo P¹; Barbosa, Barbara M¹; Rainho, Cláudia A¹

¹Department of Genetics, Institute of Biosciences of Botucatu, Sao Paulo State University (UNESP)

diogo_pessuto@hotmail.com

Colon adenocarcinoma (COAD) is the most common type of primary intestine carcinoma. Recent advances in the molecular subtyping of colon cancer have identified specific profiles characterized by different genomic and epigenomic instabilities: i) chromosome instability accounting for 85% of cases, microsatellite instability (MSI), CpG island methylator phenotype (CIMP) and DNA global hypomethylation. Research on gene expression profiles also provides new improvements in the understanding of colon carcinogenesis. In this context, aberrant gene expression profiles resulting from increased histone deacetylase (HDAC) activity and histone hypoacetylation have been implicated in COAD progression and resistance to chemotherapy. HDACs are a family of chromatin modifying enzymes that remove acetyl groups from lysine residues of the histone proteins. These proteins are grouped into classical HDACs that share the same catalytic mechanism and conserved deacetylation domain [class I (HDACs 1, 2, 3 and 8); class IIa (HDACs 4, 5, 7 and 9); IIb (HDACs 6 and 10); IV (HDAC11)] and seven sirtuins (SIRT1-7), which are NAD⁺-dependent. This study was performed to evaluate if the expression levels of genes encoding HDACs are associated with clinical (stage and disease survival) and prognostic parameters (MSI, K-RAS and BRAF mutations) in COAD. Normalized transcript levels determined by RNA-Seq from COAD (n=262) and normal colon tissues (n=41) were retrieved from the public funded project The Cancer Genome Atlas (TCGA) through Wanderer (<http://maplab.cat/wanderer>) and TCGAportal (<http://tumorsurvival.org/TCGA/>). Associations between gene expression levels and prognostic parameters were evaluated by the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests. Differences with p<0.05 were considered significant. Survival analyses were based on Kaplan-Meier curve. All class I HDAC genes, with the exception of HDAC1, are overexpressed in COAD compared to normal colon tissue. HDACs 7 and 10, respectively from classes IIa and IIb, are the only ones overexpressed in their groups. Among these differentially expressed genes, high levels of HDACs 7 and 10 were associated with lower survival rates. No significant associations were detected between gene expression and the other parameters. These preliminary data demonstrated that class I HDACs as well as HDACs 7 and 10, are differentially expressed in colon cancer. Additional studies are clearly necessary to better characterize the HDACs levels as biomarkers and potential therapeutic target in COAD.

Keywords: epigenetics, HDACs, therapeutic target

Financial support: This study was financed in part by CNPq and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Finance Code 001.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL DOS CARREADORES DE DICARBOXILATOS (DICS) DE *Arabidopsis thaliana*

Arcuri, Mariana L. C.¹; Maia, Ivan de Godoy¹

¹ Departamento de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP.

Os carreadores de dicarboxilato (DICs) são proteínas mitocondriais pertencentes à família de carreadores mitocondriais, sendo responsáveis pelo influxo de dicarboxilatos através da membrana mitocondrial interna às expensas de fosfato inorgânico e elementos derivados de enxofre. Os dicarboxilatos são substratos e intermediários essenciais na respiração celular durante o ciclo de Krebs podendo estabelecer, ainda, relações com outras rotas metabólicas como, por exemplo, na síntese de aminoácidos e nucleotídeos e, também, na gliconeogênese. Na planta modelo *Arabidopsis thaliana* foram identificados três genes decodificadores de DICs (*AtDIC1-3*). Dois deles (*AtDIC1-2*) apresentam expressão enriquecida e generalizada, enquanto que o terceiro (*AtDIC3*), tem expressão restrita a botões florais e sílicas. O gene *AtDIC2* é reportado na literatura como altamente induzido em resposta à injúria mecânica e toque, o que sugere um potencial envolvimento na resposta e tolerância das plantas aos estresses. Análises de acúmulo de espécies reativas de oxigênio de linhagens mutantes de inserção para os referidos genes (*atdic1-3*), indicam maior acúmulo de peróxido de hidrogênio entre linhagens *knockouts*, acúmulo este mais intensamente observável em *atdic2*. As taxas de germinação das linhagens supracitadas também revelaram-se comprometidas, em condições controle, a velocidade de germinação de linhagens *atdic1-2* foi prejudicada em, aproximadamente, 10%, enquanto que a linhagem *atdic3* apresentou-se menos afetada pelo *knockout*, apresentando velocidade de germinação estatisticamente similar à da linhagem *wild-type*. Quando analisadas sob indução de estresses abióticos (Manitol 150mM e NaCl 100mM), as taxas de germinação foram drasticamente afetadas, sendo a linhagem *atdic2* a mais sensível, apresentando redução de 41,11% e 22,22% nos índices de germinação, respectivamente. A nível molecular, a expressão de *AtDIC2* apresenta-se intensamente responsiva a condições de estresses abióticos, especialmente na presença de manitol, revelando-se induzida a partir de 6 horas após aplicação de estresse em linhagens *wild-type*, assim mantendo-se ao longo dos tempos amostrados (12 horas e 24 horas). Já em linhagens *atdic1-3*, observa-se o efeito compensatório nos níveis de expressão de *AtDIC1-3* em condições controle e tratadas, destaca-se a alteração na expressão de *AtDIC1,3* na linhagem *atdic2* ao longo dos tempos de indução de estresse amostrados, o que sugere uma forte relação de efeito compensatório devido ao intenso *knockdown* da expressão de *AtDIC2* endógena observado na linhagem *atdic2* (aproximadamente, 91%).

Palavras-chave: carreadores de dicarboxilato, caracterização molecular, expressão relativa, estresse abiótico.

IN SILICO ANALYSIS OF A GLOBAL piRNAs EXPRESSION PROFILE IN SKELETAL MUSCLE OF PACU, TAMBAQUI AND THE HYBRID, TAMBACU

Paula, Tassiana G.¹, García, Geysson J.F.¹, Fantinatti, Bruno E.¹, Mareco, Edson A.², Moraes, Leonardo N.¹, Oliveira, Jordana I N.¹, Zanella, Bruna T.T.¹, Valente, Jéssica S.¹, Pereira, Guilherme G.¹, Carvalho, Robson F.¹, Dal-Pai-Silva, Maeli¹

¹São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil.

²University of West São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

tassianagutierrez@gmail.com

The fish *Colossoma macropomum* (tambaqui) and *Piaractus mesopotamicus* (pacu) have great acceptance in the consumer market and present desirable characteristics for production, as rapid growth and optimal food adaptation. However, the tambacu, resulted from the hybridization between tambaqui and pacu, presents characteristics that overlap those observed in the parental, which makes it most suitable for cultivation. Growth and maintenance of muscle phenotype are controlled by signaling pathways responsible for cellular functions and small non-coding regulatory RNAs, called piRNAs, participate in the control of gene regulation. PiRNAs are expressed in intergenic regions called clusters. These molecules regulate mainly the transposons activity, elements that present a high risk of genome damage. Considering that piRNAs are essential for preserving normal germ and somatic cells parameters, the aim of this work was to analyze, in the fast muscle of juveniles pacu, tambaqui and the hybrid tambacu, the global piRNAs expression profile in clusters shared by the three genotypes. Five samples of each genotype (pacu, tambaqui and tambacu) were sent to sequencing in the LC Sciences, 2575 W, Bellfort, Ste 270, Houston TX 77054, ph 713-664-7087. The sequencing was performed in the next-generation Illumina – HiSeq 2500 platform and the data were provide by the FTP link. The prediction of the piRNA clusters was performed by the proTRAC program using as a model the *Pygocentrus nattereri* genome (NCBI annotation) to execute the analysis, since the genome of the genotypes studied aren't available. We found two clusters shared between the genotypes with statistically significant values ($p < 0.05$ /expression value $< 1.5x$) and seven piRNAs highly expressed, belonging to these clusters. The next step of the study will be to validate these piRNAs and investigate their possible targets to better understand the function of these small molecules in the signaling pathways that control muscle phenotype. We believe that our results could represent a reference study for other investigations in Brazilian fish species of commercial interest, as well as contribute to a possible identification of biomarkers related to muscle growth.

Keywords: piRNAs, skeletal muscle, pacu, tambacu, tambaqui.

Grants: Research Foundation (FAPESP, Process: 2017/16479-4).

EFFECTS OF THE PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF *Leishmania major* TELOMERASE ACTIVITY

Whisnayder, Gentil M.¹, Edna, Morea G. O¹, Maria, Cano I. N.¹

¹ Genetics Dept., Biosciences Institute, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP, Brazil. whisnayder@gmail.com.

Parasites of the genus *Leishmania* are unicellular eukaryotes that cause leishmaniasis, a spectrum of diseases that affect millions of people in the world and for which there are no effective control programs or therapies. For this reason, intensive research efforts to better understand the biology of these parasites have been made in the last years. Telomeres have been proposed as potential targets against leishmaniasis due to their important role in maintain genome stability and cell proliferation. Similar to other eukaryotes, *Leishmania* spp. telomeres are composed by repetitive TTAGGG sequences maintained by telomerase. The parasite telomerase complex is minimally composed of a protein (TERT, telomerase reverse transcriptase) and an lncRNA (TER, Telomerase RNA) that represent the enzyme catalytic core. Many different classes of telomerase inhibitors have been described in the literature and BIBR1532 (2-[E]-3-naphtalen-2-yl-but-2-enylamino]- benzoic acid) has been shown to interfere with enzyme processivity by inhibiting telomere elongation, with a strong ability to inhibit the viability of different cancer cell types. BIBR1532 is a non-nucleoside and non-competitive small molecule that specifically interacts with the FVYL motif within the enzyme catalytic domain, destabilizing the assembly of TERT-TER complex. In the present work we show that *Leishmania* TERT contains a partially conserved FVYL motif and determined the IC50 of BIBR1532 for *L. major* promastigotes. In order to test the effects of BIBR1532 on parasite proliferation we performed different cell viability tests. Our preliminary results showed that BIBR1532 affects not only cell proliferation and physiology, leading to morphological alterations such as loss of flagellum and formation of intracellular vacuoles, but depending on the treatment schedule, BIBR1532 can also induce alterations in telomere length and cell death. This is the first study showing that a telomerase inhibitor is able to induce growth arrest and cell death in a pathogenic parasite, opening an avenue to test other compounds that may affect *Leishmania* spp. telomeres.

Keywords: *Leishmania*; Telomerase; Telomeros; TERT; CRISPR/Cas9.

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF microRNAs IN BOVINE OOCYTES HEAT-STRESSED DURING *IN VITRO* MATURATION

Souza, Vanessa G. P. ¹; Munk, Michele ¹; Lemos, Diana R. ²; Guimarães, Judith M. O. ¹; Souza, Gustavo T. ¹; Camargo, Luiz S. A. ²

¹ Federal University of Juiz de Fora, Biology Department, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

² Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA), Laboratory of Animal Reproduction, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

vanessagpds@gmail.com

Thermal stress is an important factor contributing to low fertility in cattle. Alterations in gene expression in oocytes and embryos submitted to heat shock have been reported, suggesting the epigenetic influence of elevated temperature on impairment of oocyte and embryo viability. MicroRNAs (miRNAs) are an important class of non-coding RNAs, classified as essential epigenetic modulators. Recently, studies focused on the evaluation of miRNA expression have shown considerable changes in their expression profiles associated with the response to stress, the results point to the expression profile of miRNAs as an important tool to provide biomarkers genes, in addition to new insights on how thermal stress may affect the epigenome and bovine reproductive performance. In this context, the present work aimed at evaluating the expression of five target miRNAs (Bta-miR-20a, 19b, 27b, 30a-5p and 1246) in bovine oocytes submitted to thermal shock during *in vitro* maturation (IVM). The selected miRNAs were previously related to the thermal stress response in the peripheral blood bovine. Ovaries obtained from the local slaughterhouse were used to obtain cumulus-oocyte complexes (COCs). Selected COCs were matured at temperatures according to the following experimental groups: (G1) 38.8°C for 24 hours and (G2) 41°C for the first 12 hours and 38.8°C for the further 12 hours. After maturation, the COCs were treated with hyaluronidase, washed and stored at -80°C until RNA extraction. We performed total RNA extraction and cDNA synthesis with commercial kits following the manufacturer's protocol. Relative quantification was performed in triplicate by Real-Time PCR with the Sybr Green system. The expression of the Let-7a miRNA was used as an endogenous reference. The efficiency of the primers was calculated using LinRegPCR for each reaction. Relative quantification calculations were performed by the REST software based on the comparative quantification of Ct. The differences were considered significant at the 95% confidence level ($p < 0.05$). The results showed that miRNAs Bta-miR-20a (1.66 ± 0.91), miR-19b (2.18 ± 1.07), miR-27b (1.88 ± 0.97) and miR-30a -5p (1.69 ± 0.88) were upregulated. Our findings are in agreement with those previously described in the literature, in which variations in gene expression in response to stress are observed, differentially expressed miRNAs may be involved in regulatory responses to heat stress. Our study provides an overview of the expression profile of miRNAs, which assists in understanding the important roles of miRNAs in bovine oocytes under thermal stress.

Keywords: Epigenetics. Thermal Stress. Transcribed.

Support: Capes, CNPq, EMBRAPA, Fapemig.

COBALT-CHROMIUM-ENRICHED MEDIUM AMELIORATES SHEAR-STRESSED ENDOTHELIAL CELL PERFORMANCE

Machado, Mariana I. P.¹; Gomes, Anderson M¹.; Rodrigues, Marcel F.¹; Pinto, Thais da S.¹; Bezerra, Fábio J.¹; Zambuzzi, Willian F.^{1,2}

¹Dept. of Chemistry and Biochemistry, Bioscience Institute, State University of São Paulo – UNESP, *campus* Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brazil. ²Electron Microscopy Center, IBB, UNESP, Botucatu – SP, Brazil.

mariana.issler@unesp.br

Biomedical materials research is an interdisciplinary field, which brings together engineering knowledge, physical-chemical aspects and biological fundamentals for the patient's wellbeing. Angiogenesis is relevant for the success of bone healing surrounding the implant providing delivery of substances and molecules necessary for the *bone de novo* deposition and endothelial cells play important roles on this matter. Within of the repertory of metal alloys, cobalt-chromium (Co-Cr) has emerged with very interesting properties for biomedical applications. As released molecules from implants are able to modulating cells away, we investigated Co-Cr-enriched medium considering a biological model experimentally subjecting endothelial cells (HUVEC) to shear-stress concomitant to the response to Co-Cr-enriched medium to allow investigating intracellular aspects responsible to cytoskeletal rearrangement, viability and extracellular matrix (ECM) remodeling processes. Surface modification, *Shear-Stress* and the interaction between the factors extremely modulated the transcription of all analyzed genes related to the extracellular matrix on this study. The MMP's activities were also extremely modulated by both factors and their interaction. Overall, our results demonstrate that Co-Cr affects shear-stressed endothelial cells favoring cellular mechanism required for angiogenesis and they bring novel insights to explain the biological activity of Co-Cr as an interesting biomedical device to be explored within medical and dentistry fields, surface modification on cobalt-chromium treatment impacted all members of the MAPK family analyzed in this study, considering both mRNA expression or protein levels. Regarding cell cycle analysis, the expression of CDK4 gene was observed to be modulated by the interaction of the factors evaluated in this study, suggesting an increase in the transcription of several enzymes in response to these stimuli, where the modulation in the expression of P15 and P21 indicates a regulatory mechanism in this context. In addition, transcription of cell cycle members was modulated by shear stress. Therefore, our results indicate a high ECM remodeling in response to Co-Cr-enriched medium suggesting effective fate on angiogenesis stimulus and this statement guarantees important biological characteristic recapitulating physiological wound healing process.

Key words: Biomaterials; Implants; Cobalt-Chromium; Endothelial cell; Blood vessel.

IDENTIFICATION KEY FOR THE CHAGAS DISEASE VECTORS OF THE LARGEST BRAZILIAN URBAN CENTER, BASED ON CYTOGENETICS DATA

Borsatto, Kelly C.¹, Azeredo-Oliveira, Maria T. V. ¹, Alevi, Kaio C. C. ^{1,2*}

¹Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil.

²Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCFAR/UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú km 1, 14801-902, Araraquara, SP, Brasil.

kellyborsatto@gmail.com

Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and the main form of transmission of *T. cruzi* is through triatomine feces contaminated with the parasite. To date, the epidemiological surveys indicate that the São Paulo state presents 11 species of triatomines (*Panstrongylus diasi*, *P. megistus*, *P. geniculatus*, *Triatoma rubrofasciata*, *T. tibiamaculata*, *T. infestans*, *T. sordida*, *T. wygodzinskyi*, *Psammolestes tertius*, *Rhodnius neglectus* and *R. domesticus*), and most of these species have already been collected in a home environment and found infected with *T. cruzi*. Problems in correctly identifying species can lead to incorrect panorama of distribution of Chagas disease vectors. Therefore, we developed an identification key using cytogenetic characteristics (karyotype, constitutive heterochromatin pattern in chromatin and chromosomes and localization of 45S rDNA probes) to aid in the correct classification of triatomines of the São Paulo state. The insects, provided by the Araraquara Triatominae insectarium, were dissected, its testicles were torn apart, crushed and fixed on slides. Afterward, we used the C-banding (for karyotype and constitutive heterochromatin pattern analysis) and FISH (for localization of 45S rDNA) techniques and analysed by the light and fluorescence microscopy, respectively. All analyzed species were differentiated by one or more cytogenetic characteristics (*P. megistus*: karyotype $2n = 21$; *T. rubrofasciata*: karyotype $2n = 25$; *T. tibiamaculata* and *P. geniculatus*: karyotype $2n = 23$, but *T. tibiamaculata* presents prophase with heterochromatic blocks dispersed inside the nucleus and *P. geniculatus* without heterochromatin blocks dispersed inside the nucleus; *T. infestans* and *T. sordida*: karyotype $2n = 22$ and prophase with heterochromatin blocks dispersed inside the nucleus, but *T. infestans* presents heterochromatin in 3-4 large pairs of autosomes and *T. sordida* presents heterochromatin in the all autosomes; *R. neglectus* and *R. domesticus*: karyotype $2n = 22$, prophase without heterochromatic blocks dispersed inside the nucleus and chromocenter formed by three heterochromatic corpuscles, but *R. neglectus* presents absence of heterochromatin in autosomes and *R. domesticus* presence of heterochromatin in some autosomes; *T. wygodzinskyi* and *P. tertius*: karyotype $2n = 22$, prophase without heterochromatic blocks dispersed inside the nucleus and chromocenter formed by only one heterochromatic corpuscle, but *T. wygodzinskyi* presents 45S rDNA probe located in autosomes and *P. tertius* presents 45S rDNA probe located in X and Y chromosomes) which allowed the development of the key called cytokey. We emphasize the importance of using this key as a simple and objective tool in the entoepidemiological surveys conducted by the vector control programs.

Key words: cytogenetics; taxonomy; Triatominae subfamily

Financial Support: FAPESP (2013/19764-0), CAPES and CNPq

ESTUDO DA HERANÇA, TRANSMISSÃO E MANUTENÇÃO DE CROMOSSOMOS B EM *Astyanax paranae* ATRAVÉS DE CRUZAMENTOS DIRIGIDOS

Goes, Caio A. G.¹; Silva, Duílio M. Z. A.²; Utsunomia, Ricardo¹; Foresti, Fausto²; Porto-Foresti, Fábio¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP) – campus de Bauru.

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP) – campus de Botucatu.

caioaggoes@gmail.com

O gênero *Astyanax* (Characiformes, Characidae) se destaca como um dos mais abundantes em espécies dentre os peixes Neotropicais. Neste grupo, cromossomos B já foram observados em pelo menos dez espécies, dentre as quais a variante presente em *Astyanax paranae* se destaca por ser um isocromossomo que apresenta diversos tipos de DNAs repetitivos, além de genes de cópia única, caracterizando-se como um importante modelo de estudo para cromossomos B. Embora muitas sequências de DNA já tenham sido caracterizadas neste elemento, dados sobre os padrões de herança destes cromossomos jamais foram coletados e analisados. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a herança e distribuição de cromossomos B em *A. paranae* através de cruzamentos dirigidos entre indivíduos portadores e não portadores de cromossomos B. Os cruzamentos foram realizados através do método de reprodução semi-natural e direcionados da seguinte maneira: um cruzamento controle (fêmea e macho não-portadores de cromossomo B); um cruzamento com fêmea portadora e macho não-portador (cruzamento 1); e um cruzamento de fêmea não-portadora e macho portador (cruzamento 2). As larvas resultantes desses cruzamentos foram fixadas em álcool e a identificação de indivíduos portadores de supranumerários foi realizada através da quantificação relativa do gene *sbno* (conhecido por estar presente no cromossomo B desta espécie) através do método de qPCR, sendo todos os indivíduos analisados em triplicatas independentes. Com estes dados, foi possível calcular a taxa de transmissão de cromossomos B (kb) a partir da média do número de cromossomos B da progênie, dividido pelo número total de B dos parentais. Vinte larvas foram analisadas do cruzamento controle, sendo nenhuma portadora de supranumerários. No cruzamento 1, 49 larvas foram analisadas, sendo 29 portadoras e 20 não portadoras (Kb=0,591) e no cruzamento 2, foram analisadas 41 larvas, sendo 18 portadoras e 23 não portadoras (Kb=0,439). Até o presente momento, as razões obtidas mostraram-se próximas ao estado de neutralidade (kb=0.5), embora tenha sido possível notar uma tendência à acumulação no cruzamento 1. Desta forma, é possível dizer que a transmissão dos cromossomos B encontra-se em estado de neutralidade, sendo possível a eliminação deste elemento da população natural na ausência de uma nova mutação que devolva a capacidade de acumulação.

Palavras-Chaves: Peixes Neotropicais, Cromossomos B, Citogenética

Apoio: CAPES, CNPq, FAPESP, CEPTA-ICMBio.

DNA DISPOSITION RICH IN AT AND CG AS DIAGNOSIS TO SPECIES FROM THE *Triatoma brasiliensis* COMPLEX (HEMIPTERA, TRIATOMINAE)

Garcia, Ariane C. C.¹, Maria T. V. Azeredo-Oliveira², Alevi, Kaio C. C.^{1,3}

¹ Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBB/UNESP - Botucatu, SP.

² Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP - São José do Rio Preto, SP.

³ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCFAR/UNESP - Araraquara, SP.

ariane.garcia@outlook.com

The *Triatoma brasiliensis* complex is a group of species with its dispersion center on the Brazilian Northeast, and *T. brasiliensis* as the main vector specie of the Chagas disease. This complex is a monophyletic group is compounded by eight taxa, *T. brasiliensis*, *T. juazeirensis*, *T. melanica*, *T. petrocchiaae*, *T. lenti*, *T. bahiensis*, *T. sherlocki* and *T. b. macromelanosoma*. However, many species were wrongly clustered inside the *T. brasiliensis* complex as *T. melanocephala*, *T. vitticeps* and *T. tibiamaculata*, pointing out the need to establish diagnostic characteristics to assist the new taxa framing with this group of vectors. Based on this, we characterize the DNA pattern rich in AT and CG on the chromatin and on the chromosomes from the *T. brasiliensis* complex species and compared with other Latin America complexes, with a taxonomic focus. Five copies from each one of the eight taxa were cytogenetically analysed from the *T. brasiliensis* complex. The insects, provided by the Araraquara Triatominae insectarium, were dissected, its testicles were torn apart, crushed and fixed on slides. Afterward, we used the banding technique CMA₃/DAPI, that highlights the regions rich in AT (DAPI⁺) and CG (CMA⁺) on the species genome and analysed by the fluorescence microscopy technique. All the *T. brasiliensis* complex species presented the same pattern: autosomes and X sex chromosome rich in CG, and Y sex chromosome rich in AT. This pattern allows us to tell the *T. brasiliensis* complex species apart from several others, such as *T. rubrovaria*, *T. matogrossensis*, *T. phyllosoma* e *T. vitticeps* complexes that does not present regions rich in CG on the autosomes. Based on this, the DNA rich in AT and CG on the species genome characterization from the *T. brasiliensis* complex demonstrates itself as an important diagnostic characteristic to the group, making possible its differentiation from many others Latin America complexes.

Key-words: cytotaxonomy, banding CMA₃/DAPI, Chagas disease vector.

Financial support: CAPES and CNPq.

PHYLOGENETIC RECONSTRUCTION CONFIRMS CRYPTIC SPECIATION IN *Triatoma vitticeps* (HEMIPTERA, TRIATOMINAE)

Cesaretto, Natália R.¹, Fernanda F. Madeira², Alevi, Kaio C. C.^{1,3}

¹ Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBB/UNESP - Botucatu, SP.

² Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, IBILCE/UNESP - São José do Rio Preto, SP.

³ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCFAR/UNESP - Araraquara, SP.

nrcesaretto@gmail.com

Triatoma vitticeps is an endemic species of Brazil with vectorial importance in the transmission of Chagas' disease, as there are reports of adults colonizing domiciliary regions, as well as the capture of specimens infected with the protozoan *Trypanosoma cruzi* (etiologic agent of Chagas disease) in residences. Genetic distance analysis with mitochondrial genes (16S, Cyt B and COI) revealed a high intraspecific distance between *T. vitticeps* from Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ) and Espírito Santo (ES), which led to the hypothesis that which today is characterized as *T. vitticeps* is possibly a complex of cryptic species (or subspecies). Based on that, we performed a phylogenetic analysis on *T. vitticeps* from the three Brazilian states, through the mitochondrial gene cytochrome b (cyt b), in order to evaluate if this vector represents a taxon or a complex of morphologically identical taxa. Three specimens of each locality were molecularly analyzed. The insects were provided from the “Insetário de Triatominae” of Araraquara. As outgroup we used *T. melanocephala*, a species phylogenetically related to *T. vitticeps*. Genomic DNA was extracted from the legs of adult specimens using the DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN). The amplification of the fragments was done by Polymerase Chain Reaction (PCR) using primers of the Cyt B gene described in the literature. The amplification products were visualized by 1% agarose gel electrophoresis, purified by the GFX Purification kit (GE Healthcare) and sent for sequencing (USP-SP). Editing and multiple alignment of the sequences was done manually in BioEdit 7.0.5.3 software with the ClustalW tool. Subsequently, the sequences were concatenated through the Seaview 4 program and the concatenated alignment was submitted to the jModeltest program to evaluate the best model of nucleotide substitution. According to the Akaike information criterion (AIC) score, the best model was GTR+I+G, which was used in the Bayesian Inference analysis. The phylogenetic reconstruction rescued three distinct clades, referring to the states of ES, MG and RJ. These clades represent three distinct species, being *T. vitticeps* from RJ the official representative *T. vitticeps* (since it is the collecting location of the type described in 1859) and the MG and ES insects representing two new cryptic species related of *T. vitticeps*. Thus, our results confirm the cryptic speciation phenomenon described for *T. vitticeps* and signals the existence of two new related taxa to *T. vitticeps*.

Keywords: taxonomy, cytochrome b, Chagas disease vectors.

Financial Support: FAPESP (Processo nº 2017/05015-7), CAPESP and CNPq.

MMASAT85-52: O DNA SATÉLITE MAIS ANTIGO ENCONTRADO EM PEIXES TELEÓSTEOS

Santos, Rodrigo Z.¹; Rodrigues, Pedro H. M.¹; Silva, Duílio M. Z. A.²; Foresti, Fausto², Porto-Foresti, Fábio¹; Utsunomia, Ricardo^{1,2}

¹Universidade Estadual Paulista (campus Bauru), Departamento de Ciências Biológicas.

²Universidade Estadual Paulista (campus Botucatu), Departamento de Morfologia.

rodrigo-zeni@hotmail.com

Os genomas eucarióticos estão repletos de sequências de DNA repetitivo, como os DNAs satélites (satDNAs), conhecidos por constituírem longos *arrays* de repetições em *tandem*. Em geral, essas sequências estão localizadas na heterocromatina e em sua maioria não codificam nenhum produto funcional. Além disso, os satDNAs são conhecidos por apresentarem uma dinâmica evolutiva bastante elevada, o que está associado ao fato de que muitas destas sequências sejam espécie- ou gênero-específicas. Nesse contexto, são muito raros os casos de satDNAs conservados em nível de família ou ordem, como por exemplo o *alpha-satellite* que está presente nos centrômeros dos primatas ou *PstI* encontrado em peixes esturjões e com idade de surgimento aproximada em 90 milhões de anos. A recente divulgação dos satelitomas (e.g. coleção completa de DNAs satélites de um genoma) de espécies pertencentes a famílias distantes e inseridas na ordem dos peixes Characiformes, revelou a surpreendente existência de um satDNA bastante conservado nesta ordem. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar se o MmaSat85-52 é, de fato, um satDNA ordem-específico, bem como delimitar a sua origem na história evolutiva dos peixes Teleósteos. Para isso, diferentes bibliotecas de sequenciamento Illumina de múltiplas espécies de Otophysa (incluindo as ordens dos Gymnotiformes, Characiformes, Siluriformes e Cypriniformes) foram avaliadas para a presença deste satDNA. Inicialmente, as buscas através do algoritmo BLAT evidenciaram que este satDNA está presente apenas nas espécies de Characiformes (8 famílias). Posteriormente, realizamos o isolamento e alinhamento dos monômeros deste satDNA para cada uma das espécies estudadas e os resultados revelaram extensas variações de abundância entre cada uma das espécies, porém sem uma demasiada variação nucleotídica, principalmente em nível intragenômico, revelando uma intensa homogeneização destas sequências por evolução em concerto. Os resultados obtidos revelaram que o MmaSat85-52 surge há mais de 110 milhões de anos (estimativa da diferenciação de Characiformes) e se mantém nos genomas das diferentes espécies desta ordem. No entanto, em uma das espécies deste grupo, *Hoplias malabaricus*, esta sequência parece ter sido perdida. Diante disso, conclui-se que todos os organismos vivos possuem uma biblioteca com uma ampla diversidade de famílias DNAs satélites e a abundância e diversidade destas sequências nos táxons terminais são alteradas por processos contingentes. Os resultados descritos aqui apontam para um DNA satélite “congelado” em Characiformes.

Palavras-Chaves: Peixes Neotropicais, Satelitoma, Bioinformática

Apoio: FAPESP, CAPES, CNPq

DNA BARCODE IN THE IDENTIFICATION OF COMMERCIALY EXPLOITED SPECIES OF RAYS IN SÃO PAULO STATE

Oliveira, Raul BC¹, Daneluz, Cahique M¹, Prado, Fernanda D¹, Rodrigues Júnior, Carlos E², Porto-Foresti, Fábio¹

¹Universidade Estadual Paulista (Bauru), Departamento de Ciências Biológicas.

²Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)

raulbarrera_3@hotmail.com

Stingrays are cartilaginous fish that present the body flattened dorso-ventrally, plus six or seven pairs of gill slits and developed pectoral fins fused to the head. In Brazil, 29 species of sea rays are in extinction risk. Due to decharacterization and the grouping of all species of rays in a single NCM (Mercosur Common Nomenclature), the species of commercialized rays are often difficult to identify. The DNA Barcode is a species-specific molecular identification system based on the mitochondrial DNA sequence Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) with about 650 base pairs. This system has been used successfully to identify samples that are marketed, such as sharks and other groups threatened with extinction. Thus, the present work aims to generate data about the species of streak marketed in the state of São Paulo and to investigate if there is an illegal commercialization of endangered species, besides validating the technique as a routine tool to control the trade of stingrays. For this, 41 specimens of individuals marketed in the cities of Bauru, São José do Rio Preto, Campinas and São Paulo were sampled and analyzed. Genomic DNA was extracted from the muscles of the individuals and preserved for further studies. Species level identification was performed with amplification of the COI genes by the Polymerase Chain Reaction (PCR). Subsequently, the PCR products were purified and sequenced, where the results were aligned in the Geneious 4.8.5 program, resulting in consensus sequences. The sequences were submitted to the database of the BOLD platform, where they were compared to the 100 most similar sequences, obtaining identification at the species level. After analysis, 7 species were identified, of which 13 individuals are of the species *Paratrygon ajereba*, 10 *Potamotrygon motoro* and 10 *Hypanus dipterurus*, all classified as insufficient data (DD) according to the IUCN Red List of Threatened species, in addition to 3 *Gymnura altavela*, 2 *Epinephelus marginatus* and 2 *Atlantoraja platana*, classified as vulnerable (VU) and 1 *Atlantoraja castelnaui*, categorized as endangered. In this way, we can see that there are at least four species at risk of extinction being marketed in the state, and three other species are not officially in a threat status, since animals that lack information are classified in category DD about conservation status based on population status and distribution.

Keywords: Chondrichthyes, illegal trade, DNA barcoding.

Support: IBAMA.

DINÂMICA CROMOSSÔMICA E GÊNOMICA DE DNAs SATÉLITES EM ESPÉCIES DE Characidae (Characiformes, Teleostei)

Rodrigues, Pedro H. M.¹; Santos, Rodrigo Z.¹; Silva, Duílio M. Z. A.²; Foresti, Fausto², Porto-Foresti, Fábio¹; Utsunomia, Ricardo^{1,2}

¹Universidade Estadual Paulista (Bauru), Departamento de Ciências Biológicas.

²Universidade Estadual Paulista (Botucatu), Departamento de Morfologia.

pedrinhmr96@gmail.com

DNAs satélites (satDNAs) são sequências repetitivas organizadas em tandem, variando de poucas centenas a milhares de repetições, constituindo a maior parte da heterocromatina e geralmente encontrada nas regiões pericentroméricas e subteloméricas. Do ponto de vista citogenético, estas sequências são consideradas importantes marcadores cromossômicos, apresentando uma alta dinâmica evolutiva, tanto pela sua característica saltatória nos genomas, quanto pela rápida diversificação nucleotídica, resultando na ampla existência de satDNAs espécie-específicos. Os objetivos do presente trabalho foram utilizar-se das técnicas de NGS para delimitar a ocorrência taxonômica de dois satDNAs, comparar a abundância e a localização cromossômica destas sequências entre duas populações distintas através da hibridização *in situ* fluorescente (FISH), e investigar a variação intra- e interespecífica dos MsaSat03-80 e MsaSat04-142 nos níveis cromossômicos e nucleotídicos. Para isso, os genomas de duas amostras da espécie de peixe *M. sanctaefilomenae* provenientes de duas bacias hidrográficas distintas (Paranapanema e Tietê) foram sequenciados com a plataforma Illumina HiSeq2000 (paired-ends 2x101bp). Dois satDNAs isolados previamente foram utilizados como referência para buscas *in silico* através do algoritmo BLAT nas bibliotecas sequenciadas e em outros genomas completos de famílias relacionadas, posteriormente, monômeros completos dos dois satélites foram isolados diretamente dos reads Illumina para análises de abundância e divergência. Os resultados mostraram que o MsaSat04-142 parece ser exclusivo de *M. sanctaefilomenae* e MsaSat03-80 apenas em peixes da família Characidae, a seleção final de sequências que apresentaram similaridade com o MsaSat03-80 resultou em 294 (Tietê) e 324 (Paranapanema) monômeros completos, enquanto que para o MsaSat04-142 obtivemos 140 (Tietê) e 329 (Paranapanema), números compatíveis com os dados cromossômicos obtidos aqui, uma vez que o número de clusters cromossômicos do MsaSat03-80 é similar nas duas populações (4 pares cromossômicos), enquanto que a população do rio Paranapanema apresenta um sítio cromossômico a mais de MsaSat04-142 em relação às amostras do rio Tietê. Árvores de extensão mínima construídas mostraram que o MsaSat04-142 apresentou, em ambas as amostras, valores de números de haplótipos e diversidade nucleotídica mais elevados em relação ao MsaSat03-80. Nossos resultados mostram que a origem do DNA satélite MsaSat04-142 é recente, com níveis de homogeneização entre as sequências menores em relação ao MsaSat03-80. Por outro lado, o MsaSat03-80 apresenta menores valores de diversidade haplotípica, indicando um estágio avançado de homogeneização, em congruência com sua origem mais antiga, uma vez que pudemos detectar esta sequência em outro Characidae.

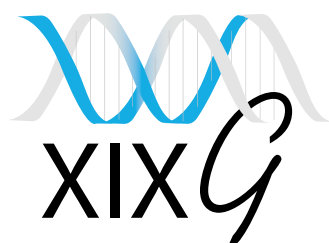
Palavras-chave: Sequências repetitivas, Satelitomas, genoma, bioinformática.

Apoio: FAPESP, CAPES, CNPq



**“SOMEWHERE,
SOMETHING
INCREDIBLE
is waiting to be known”**

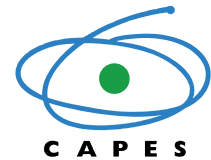
Carl Sagan



Realização



Apoio



Patrocínio

