

Anais do XX Simpósio de Iniciação Científica FACLEPP – UNOESTE

Resumos sem Resultados – Ciências Biológicas

AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS LIMNOLÓGICOS EM SISTEMA DE AQUAPONIA	2
DETERMINAÇÃO MOLECULAR DO ANTÍGENO FLAGELAR H DE ESCHERICHIA COLI DIARREIOGÊNICA.	4
EFEITOS ALELOPÁTICOS DE EXTRATOS AQUOSOS DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA SOBRE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE HANDROANTHUS ALBUS.....	9
CONTROLE DE MOSCA BRANCA (HEMIPTERA / ALEYRODIDAE) NA CULTURA DO REPOLHO COM USO DE EXTRATOS VEGETAIS"	10
CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DO PACU (PIARACTUS MESOPOTAMICUS) JUVENIS E ADULTOS	11
CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA E MOLECULAR DE ESCHERICHIA COLI DIARREIOGÊNICA	13
LEVANTAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COLEÓPTEROS COM O USO DE ARMADILHA MALAISE EM FRAGMENTO DE MATA ESTACIONAL.....	17

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS LIMNOLÓGICOS EM SISTEMA DE AQUAPONIA

FLAVIA BEATRIZ RODRIGUES

A palavra "aquaponia" é derivada da combinação entre "aquicultura" (produção de organismos aquáticos) e "hidroponia" (produção de plantas sem solo) e refere-se à integração entre a criação de organismos aquáticos, principalmente peixes, e o cultivo de vegetais hidropônicos. Apesar da aquicultura e da hidroponia serem práticas de produção de alimentos com estudos realizados há mais de cinquenta anos, as pesquisas em aquaponia somente começaram a apresentar seus resultados mais expressivos na última década (LENNARD e LEONARD, 2004; RAKOCY et al., 2006; TYSON, et al. 2008; ENDUT et al., 2010; ROOSTA e MOHSENIAN, 2012; LOVE et al., 2014; GODDEK et al., 2015). A aquicultura é um setor que vem crescendo a uma taxa aproximada de 10% ao ano. Tal crescimento tem ocorrido devido ao aumento da população mundial e ao aumento do consumo de produtos aquícolas (BIAO et al., 2004). Segundo Pedroza et al., (2016), a chegada de novas empresas, tecnologia e profissionalização gerou um crescimento de 123% durante o período de 2005 a 2015. Pedroza et al., (2016), associa também que o consumo no mercado nacional apresentou taxa de crescimento de 10% no mesmo período. Com o aumento constante na produção aquícola, aumentam também os nutrientes presentes na composição dos efluentes do processo de produção. Tais nutrientes são derivados do excesso de ração, fertilizantes empregados na adubação dos viveiros, e dos produtos metabólicos excretados (NUNES, 2002). Nos sistemas intensivos de criação de peixes a água apresenta acúmulo de nutrientes que necessitam ser eliminados para tornar a água reutilizável. Este processo de eliminação dos resíduos pode ser realizado por vegetais cultivados em hidroponia, uma vez que o excesso de nutrientes acumulado na água é por eles absorvidos (RAKOCY et al., 1993). Além disso, uma pequena proporção dos nutrientes fornecidos aos peixes na forma de alimento é retida por eles, sendo a maior parte excretada na forma sólida ou dissolvida em água o que, nos sistemas integrados gera um nível de nutrientes que se aproxima dos valores encontrados em algumas soluções nutritivas para o cultivo de vegetais (RAKOCY et al., 1993). No cenário atual de escassez hídrica que assola nosso país, atingindo inclusive regiões onde a falta d'água nunca foi um problema, a busca por técnicas de produção agropecuária inovadoras é imprescindível para atender a demanda crescente por alimento e diminuir a velocidade de esgotamento de nossos recursos hídricos. Junto com o crescimento da população, eleva-se o consumo da água e a contaminação de nossos mananciais. Portanto, precisamos encontrar soluções com baixo consumo de água e que não gerem efluentes tóxicos (CARNEIRO et al., 2015). Neste contexto, o presente trabalho tem seu foco em analisar a eficácia de sistemas de aquaponia no processo de filtragem dos compostos excretados, visando a

qualidade e reutilização da água. O objetivo geral deste trabalho é avaliar os parâmetros limnológicos em sistema de aquaponia, tendo como objetivos específicos: - Avaliar a capacidade de reutilização da água evitando o seu desperdício, diminuindo a liberação do efluente no meio ambiente. - Avaliar o potencial hidrogênico (pH) da água. - Avaliar a temperatura da água nos diferentes pontos de coleta. O experimento será realizado na AQUAPONIA FRUTOS D'ÁGUA, sediado na zona rural do município de Álvares Machado, SP. Amostras de água de diferentes pontos do sistema de criação serão coletadas e analisadas no laboratório de análises de água da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), com sede em Presidente Prudente, SP. Serão realizadas coletas aos 0, 7, 14, 21, 30 e 37 dias do início do experimento de 100ml de água de 4 pontos distintos (figura 2), sendo eles: Fonte de abastecimento (1º ponto); Saídas do tanque de cultivo (2º ponto); Após a passagem pelas hortaliças (3º ponto) e no Retorno das águas ao reservatório (4º ponto). As amostras serão coletadas a uma profundidade média de 30 cm da superfície laminar da água. Todas as amostras coletadas serão armazenadas em vidros de coloração marrom, hermeticamente fechados e autoclavados, para evitar a contaminação e influência de fatores extrínsecos. Após a coleta será realizada a análise dos parâmetros limnológicos e da temperatura e pH. Os dados obtidos serão compilados e analisados conforme os testes estatísticos adequados.

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

DETERMINAÇÃO MOLECULAR DO ANTÍGENO FLAGELAR H DE ESCHERICHIA COLI DIARREIOGÊNICA.

LUCAS JOSE DA COSTA
DAIANY RIBEIRO PAZ DE LIRA
GABRIELA SUMICO AFONÇO HANAMOTO
INAE DE OLIVEIRA GARCIA
ROBSON DIEGO SILVA GONCALVES
ROGÉRIA KELLER
HERMANN BREMER NETO
MELISSA DE SOUZA SILVA

1 INTRODUÇÃO. Há quase um século a *Escherichia coli* foi introduzida para se tornar um dos organismos modelo mais importantes e de longe o procarioto mais bem estudado. As principais descobertas envolvendo a *E. coli* foram conjugação bacteriana, recombinação, regulação genética e replicação de cromossomos, especialmente derivados de laboratório da cepa K-12, originalmente isolados das fezes de um paciente de difteria convalescente em Palo Alto em 1922 (BACHMANN BJ, 2004). A *Escherichia coli* é uma bactéria que pertence à família Enterobacteriaceae, é um bacilo Gram negativo fermentador, anaeróbio facultativo amplamente distribuído na natureza, possuindo como principal habitat o trato intestinal animal e humano (WINN WJ, ALVES S, JANDA W et al., 2008; MORATO EP, LEOMIL L, BEUTIN L et al., 2009; MOURA RA, 2009; AYALA CO, 2009; SILVA N, JUNQUEIRA VCA, SILVEIRA NFA et al., 2010). A *E. coli* comensal, pertencente a microbiota intestinal, não é patogênica, além de apresentar um importante papel fisiológico para o bom funcionamento do organismo. As *E. coli* patogênicas derivaram de ancestrais comensais após a aquisição de genes de virulência e divergiram-se em sete categorias denominadas *E. coli* diarreiogênicas. As *E. coli* diarreiogênicas são as responsáveis por causarem infecções intestinais em homens e animais, sendo diferenciadas de acordo com o sorogrupo, pelas síndromes clínicas que promovem pela presença de fatores de virulência como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas, e classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (MARTINEZ MB, TRABULSI LR, 2008; NATARO JP, KAPER JB, 1998; TENG LJ, HSUEH PR, LIAW SJ et al., 2004; NGUYEN TV, LE VP, LE HC et al., 2005). As doenças diarreicas podem resultar em óbitos, principalmente em crianças com idade inferior à cinco anos, e principalmente em países subdesenvolvidos (LIU et al., 2012). Em 1940 se descobriu a primeira *E. coli*, a EPEC, esta é considerada uma das mais versáteis entre as categorias diarreiogênicas e uma das principais causas de diarreia em crianças menores de 5 anos de idade (ALBERT MJ, FARUQUE SM, FARUQUE

AS et al., 1995; ALBERT MJ, 1996; FAGUNDES-NETO U, SCALETSKY ICA, 2000; ANGELES GR, 2002). Em 1995 foram classificadas duas subcategorias de EPEC: EPEC típica (EPEC-t) e atípica (EPEC-a). As EPEC-t são identificadas pela presença do gene *eae* (EPEC attaching and effacing) e plasmídeo EAF (EPEC adherence factor). As EPEC-a apresentam o gene *eae*, entretanto são desprovidas do plasmídeo EAF. As duas EPEC devem ser desprovidas do gene *stx* (Shiga toxina) que caracteriza STEC/EHEC (TRABULSI LR, KELLER R, GOMES TA, 2002). As EPEC-t estiveram sempre associadas à diarreia infantil, isso se deu por muito tempo, entretanto, atualmente observa-se uma redução desta subcategoria e o aumento de isolamento de EPEC-a (SOUZA EC, MARTINEZ MB, TADDEI CR et al., 2002; GHOSH PK, ALI A, 2010; MORENO ACR, FERNANDES FILHO A, GOMES TAT et al., 2010). As subcategorias são representadas por diferentes sorotipos, as EPEC-t pertencem aos sorotipos: O55:H[6], O86:H34, O111:H[2], O114:H2, O119:H[6], O127:H6, O142:H6 e O142:H34, já as EPEC-a pertencem aos sorotipo: O26:H[11], O55:H[7], O55:H[34], O86:H[8], O111ac:H[8], O111:H[9], O111:H25, O119:H2, O125:H6 e O128:H2, identificando-se mais de 200 sorotipos de EPEC-a (Ochoa TJ, Contreras CA, 2011). A *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), pertence a um subconjunto de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), a qual está associada a colite hemorrágica (HC), possui característica distintas tanto genotípicas quanto fenotípicas que as diferenciam das EPEC (YAN et al., 2012). Na maioria dos casos a EHEC é LEE positiva e forma lesões A/E como a EPEC. A STEC possui a capacidade de sobreviver em pH baixo, como por exemplo o estômago (HONG et al., 2012). A STEC, ao colonizar a mucosa intestinal, adere às células epiteliais, através do pili ou fimbrias (FARFAN; TORRES, 2012). O fator característico principal de virulência da STEC é a presença da toxina Shiga, a mesma pode ser classificada em dois tipos: Stx1 e Stx2. A Stx1 possui 3 subtipos (a, c e d), enquanto a Stx2 tem 7 (a até g) (SCHEUTZ et al., 2012). A STEC pode ter uma única variante, Stx1 ou Stx2, ou ambas, além das combinações de subtipos como Stx2a e Stx2c. A Stx2 está associada normalmente a doenças mais graves (BOERLIN et al., 1999). As Stx1 e Stx2 tem sua codificação em fagos que são associados ao cromossomo. Desta forma, os fagos transportam a toxina de Shiga e durante o estresse bacteriano, tornam-se líticos onde supõe-se que as Stx1 e Stx2 são liberadas através de células bacterianas que sofreram lise celular pelo ciclo lítico do fago. (NEELY; FRIEDMAN, 1998) A ETEC possui características específicas de virulência como enterotoxinas, que podem ser resistente ao calor (ST) ou termo lábeis (LT) (CLARKE et al., 2011) e fatores de colonização (CNF) que a distingue de outras categorias de *E. coli* diarreio gênicas. Isso permite que as mesmas possam colonizar o intestino delgado provocando consequentemente a diarreia, que pode ser leve a moderada, usualmente não sanguinolenta. (QADRI et al., 2005). As *Escherichia coli* (EIEC) e *Shigella* spp. compartilham propriedades bioquímicas, genéticas e patogênicas, referem-se à agentes patogênicos intracelulares causadores de doenças (LAN et al., 2004) que possui sua classificação dificultada devido às similaridades. Portanto, a incidência de EIEC epidemiológica deve ser estudada através de marcadores genéticos específicos. (VENKATESAN; BUYSSE; KOPECKO, 1989). Os fatores de virulência estão presente em plasmídeos que englobam componentes do Sistema Secretor tipo 3 T3SS (proteínas Mxi-Spa), os reguladores transcripcionais (VirF, VirB e MxiCE), chaperones (IpgA, IpgC, ipgE e Spa15), as translocases (IpaB, IpaC e IpaD) e por volta de 25 proteínas efetoras (SCHROEDER; HILBI, 2008). Além do plasmídeo de invasão, responsável em codificar uma série de genes, incluindo o ipaH. O tratamento se dá a partir da utilização de antimicrobianos como: macromida, azitromicina, ceftriaxona, fluoroquinolona entre outros medicamentos (KLONTZ et al.,

2012; LEGROS; PIERCE, 2005). As *E. coli* enteroagregativas (EAEC) são as causadoras de quadros de diarreia endêmica e epidêmicas em todo o mundo (RÚGELES et al., 2010), este patotipo é o mais comum segundo estudos, identificado em fezes diarreicas (NATARO et al., 2006). Em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) pode provocar diarreia aguda ou crônica. (MATHEWSON et al., 1998) As cepas de DAEC possuem aderência difusa (DA) em células epiteliais em testes laboratoriais clássicos de aderência às células HEP-2 ou HeLa. (CRAVIOTO et al., 1991) Com comportamento epidemiológico restrito aos seres humanos e patogenia bem definida, a EPEC-t representa a categoria original de EPEC. A EPEC-a está ligada à diarreia humana, pode ser considerada cosmopolita, por ser encontrada em diversos ambientes, tanto aquáticos como terrestres e encontrada em diversos animais (VIDAL JE, CANIZÁLEZ RA, GUTIÉRREZ J et al., 2007; MORATO EP, LEOMIL L, BEUTIN L et al., 2009; MOURA RA, 2009; SILVA N, JUNQUEIRA VCA, SILVEIRA NFA et al., 2010). As alterações no pH provenientes da fermentação da lactose podem ser utilizadas para diferenciar as que fermentam a lactose e as que não fermentam a lactose, pois as colônias de *E. coli* positivas a lactose se mostraram vermelhas ou rosas em meios de cultura como o ágar MacConkey. Entretanto o auxílio desses meios no isolamento da *E. coli* de outras bactérias Gram-positivas e outros grupos Enterobacteriaceae (TEBALDI et al., 2008). Por meio de patotipos adicionais como os métodos moleculares, PCR, sorotipagem entre outros, determinadas características fenotípicas e genotípicas são testadas (CROXEN et al., 2013). A sorotipagem clássica se baseia no esquema de classificação de Kauffman, nele são determinados os polissacarídeos O (somático) e os antígenos de superfície H (flagelares) (NATARO JP, KAPER JB, 1998). Métodos moleculares, assim como o PCR de genes envolvidos na biogênese de O-antígeno (por exemplo, wzx e wzy genes) e de fliC para o antígeno H, pode também ser utilizada para identificar o sorotipo (WANG L, ROTHEMUND D, COALHADA H et al., 2003). Uma ausência do antígeno H é indicada pela designação dada por NM ou H-, e que o isolado é nonmotile. Hodiernamente, existe 174 sorogrupos O de *E. coli* (DEBROY C, ROBERTS E, FRATAMICO PM, 2011) e 53 antígenos H de *E. coli* (WANG L, ROTHEMUND D, COALHADA H et al., 2003) de antígenos reconhecidos, entretanto, unicamente um pequeno subconjunto de combinações de O: H está associado à doença. Para fornecer força motriz, o flagelo bacteriano se projeta muito além da superfície da célula. O filamento flagelar composto por uma única proteína, a flagelina. Nas *E. coli* e em várias outras espécies, as proteínas flagelinas são conservadas em suas regiões terminais, enquanto que a região central é mais variável e carrega epitopos específicos para o sorotipo H (JOYS, TM, 1985; PARISH, CR, R. WISTAR E GL ADA, 1969; WEI, L. E TM JOYS, 1985; WINSTANLEY, C. E AW MORGAN, 1997). A PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado) é considerada o padrão de melhor qualidade para a tipagem e sua aplicação se dá em investigações epidemiológicas para discriminar entre os surtos (SWAMINATHAN B, BARRETT TJ, CAÇADOR SB et al., 2001). A adaptação de determinadas *E. coli* podem fazer com que características específicas de virulência sejam adquiridas, sendo assim, possuem uma maior adaptação a novos habitats e como consequência disso, são responsáveis por serem o estopim de uma grande variedade de doenças intestinais e extra intestinais, assim como a diarreia, a inflamação aguda, a colite hemorrágica, as infecções no trato urinário, a meningite neonatal e a sepse (MÜLLER et al., 2007). As características de virulência são constantemente codificadas em elementos genéticos móveis, que podem assim gerar inúmeras linhagens e consequentemente novas combinações de fatores de virulência (NYANGA et al., 2017). Sobretudo apenas as combinações mais bem-sucedidas dos fatores de virulência são as

que persistiram e se tornaram patótipos característicos de *E. coli* prontos a causar doenças, principalmente em crianças e em ambientes hospitalares (CONTRERAS, 2011). Na região da Alta Paulista não há estudos a respeito da caracterização de *Escherichia coli* através do antígeno molecular H. Portanto se faz necessário à determinação das DECs, e assim se tomar medidas profiláticas de maior eficácia nessa região, segundo a metodologia descrita por BOTELHO et al., 2013. Este estudo tem como objetivo a determinação molecular do antígeno H nas amostras de *E. coli* diarreiogênicas através do método RFLP (restriction fragment length polymorphism) a mesma permite que a qualidade do levantamento dos patógenos bacterianos diarreicos na região da Alta Paulista sejam melhoradas, fornecendo assim informações mais precisas, relativas ao espectro de patógenos associados e desse modo, realizar as medidas profiláticas necessárias nestas regiões.

2 JUSTIFICATIVA.

Atualmente temos em média 2,5 bilhões de casos de diarreia registrados em crianças inferiores a cinco anos de idade e acredita-se que a incidência da mesma, encontra-se sem variações nas duas últimas décadas. As grandes incidências de casos ocorrem em países subdesenvolvidos, onde os surtos de diarreia são mais comumente registrados, podendo assim resultar em complicações mais graves levando até mesmo a óbito. De acordo com sazonalidade e idade da criança, a incidência de doenças diarreicas pode variar, fazendo com que as crianças de menor idade sejam mais vulneráveis. Não havendo estudos, a respeito da caracterização de *Escherichia coli* diarreiogênicas através do antígeno molecular H, na região da Alta Paulista, este trabalho se faz necessário para se tomar medidas profiláticas de maior eficácia nessa região.

3 OBJETIVO GERAL.

Este estudo tem como objetivo a determinação molecular do antígeno H nas amostras de *E. coli* diarreiogênicas através do método RFLP para determinar o gene *fliC*, uma vez que a determinação do antígeno H possibilitara uma identificação mais detalhada das amostras de *E. coli* diarreiogênicas isoladas na região da Alta Paulista.

3.1 OBJETIVO ESPECIFICO.

- Realizar PCR do gene *fliC*.
- Realizar digestão enzimática com a enzima *Rsa I*.
- Avaliar o padrão enzimático das amostras para determinação do antígeno H.
- Relacionar o antígeno H e o local de isolamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Serão utilizadas amostras de crianças menores de cinco anos de idade, com quadros de diarreia aguda, doadas de laboratórios públicos e privados da alta paulista, no período de maio de 2018 a maio de 2019. A população controle de *E. coli* será obtida de crianças saudáveis, menores de cinco anos que submeteram suas fezes aos laboratórios para exames parasitológicos. Desta forma, as *E. coli* serão isoladas e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UNOESTE, de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

4.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Será realizada uma comparação observada em transformação $\arcsin \sqrt{P\%/100}$ que dará melhores resultados quando todas as porcentagens forem estimadas com um número constante (N) de indivíduos por parcela (HADDAD; VENDRAMIM, 2000) afirma que a variância da variável transformada $y = \arcsin \sqrt{X/N}$, em que X/N (proporção de indivíduos mortos) tem distribuição binomial e $P\% = X/N \times 100$, é praticamente independentemente do número de indivíduos (N) por unidade experimental, para $N \geq 20$, e que o valor teórico do quadrado médio residual se aproxima do valor $820,7/N$. De posse dessas informações, pode-se usar o teste de Tukey, ao nível α de probabilidade, para comparação entre todo e qualquer contraste entre duas médias de tratamentos, após a transformação das médias em $\arcsin \sqrt{X/N}$.

4.3 OBTENÇÃO DO DNA MOLDE

Os isolados de *E. coli* serão cultivados em ágar TSB 3mL de TSB e incubados para crescimento a 37°C por cerca de 18 horas, um repique em meio TSA foi realizado e novamente incubado para crescimento a 37°C por cerca de 18h. Um raspado contendo 5 colônias da cepa será suspenso em 200 μ l de água

bidestilada auto clavada, a suspensão bacteriana será submetida à fervura por 10 minutos seguida de uma centrifugação em micro centrífuga a 12.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante deste material será utilizado como DNA molde, e será mantido congelado há -20°C até o momento do uso.

4.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR DO GENE fliC

As reações de PCR para amplificar o gene fliC serão realizadas de acordo com o protocolo descrito por BOTELHO et al., 2003. Para tal amplificação serão utilizados iniciadores específicos adquiridos da LIFETECH com a sequência descrita abaixo: fliC (F)1:5' - ATGGCACAAGTCATTAATACCCAAC - 3' fliC (R)2:5' - CTAACCCTGCAGCAGAGACA - 3' As reações irão seguir o seguinte protocolo: 1µl de lisado bacteriano (5 colônias isoladas crescidas em TSA suspensas em 200µl de água bidestilada e submetidas à fervura por 10 minutos seguido de 1 minuto de centrifugação a 12.000 rpm) utilizado como DNA molde, Go Taq Green Master Mix 1x (PROMEGA - USA) [contendo as seguintes concentrações: 1,5 mM de MgCL₂; 200µM de cada µM dos 4 dNTP] tampão de reação 1x, 25 pMol de cada iniciador e água de injetáveis auto clavada em quantidade suficiente para (q.s.p) o volume final de reação de 25µl. As reações serão submetidas ao ciclo de amplificação, no termociclador (Mastercycle gradient - Eppendorf) sendo inicialmente aquecidas à 95°C por 3 minutos, em seguida a 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 segundos, 1 minuto a 60°C no anelamento, extensão a 72°C por 2 minutos e um ciclo à 72°C de extensão final de 7 minutos. Após a amplificação, os produtos da PCR serão submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, utilizando o padrão de massa molecular 100 pb DNA Ladder" (Invitrogen), coradas em brometo de etídio, visualizadas em transiluminador UV e fotografada pelo sistema de captura de imagem digital Universal Hood II (Biorad - Biorad Laboratories Inc., USA).

4.5 DIGESTÃO ENZIMÁTICA DOS AMPLICONS DE fliC

Os produtos de PCR serão submetidos à digestão enzimática com a enzima RsaI (Promega) conforme descrito por BOTELHO et al., 2003, com modificações. A digestão será realizada em um volume final de 20µl, composto por 7µl do produto da PCR, 10 µl de água bidestilada estéril, 2 µl de tampão de reação 10x específico para RsaI (Promega) conforme recomendado pelo fabricante e 1µl de enzima RsaI [10U/µl]. A reação de digestão será incubada em banho a 37°C por 18 horas. Após o período de incubação, o volume total da digestão será acrescido de 5µl de solução tampão corante [5x] para eletroforese, e submetido a eletroforese em gel de agarose a 2%, seguido de foto-documentação. Os padrões de RFLP do fliC das amostras será comparado com os tamanhos padrões de diversos antígenos H conforme descrito em BOTELHO et al., 2003, para assim determinar o tipo flagelar de cada amostra. Em todos os géis os padrões '1kb Plus DNA Ladder' será adotado para aferição da massa molecular dos fragmentos de restrição. . .

EFEITOS ALELOPÁTICOS DE EXTRATOS AQUOSOS DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA SOBRE A GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE HANDROANTHUS ALBUS.

PAULO HENRIQUE RODRIGUES DALE VEDOVE MORENO
WILLIAM HIROSHI SUEKANE TAKATA

Alelopátia é o processo de produção de metabólitos secundários por algum ser vivo que influenciam no desenvolvimento de outras espécies. Nas folhas e frutos *Leucaena leucocephala*, árvore exótica com potencial invasor no Brasil, é encontrado um aminoácido não proteico que tem o potencial de influenciar na germinação de espécies nativas, a mimosina. Portanto deve-se estudar os efeitos que os extratos de *Leucaena leucocephala* causam sobre a germinação de *Handroanthus albus*, espécie nativa do Brasil. O objetivo deste trabalho é estudar o efeito alelopático do extrato de diferentes órgãos da *Leucaena leucocephala* sobre a germinação de sementes de *Handroanthus albus* (Ipê amarelo). Serão coletadas folhas e frutos de *L. leucocephala* para a produção dos dois tipos de extratos (extrato de folhas e extrato de frutos) e estes serão diluídos em água destilada para a obtenção de cinco tratamentos, sendo composto pelo grupo controle (0% do extrato), 25%, 50%, 75% e 100% que serão aplicados em papeis germitest onde as sementes de *H. albus* serão colocadas para germinar. Serão utilizadas quatro repetições, cada uma contendo cem sementes e o teste de germinação será realizado em uma estufa tipo B.O.D. com fotoperíodo e temperatura controlada. Ao final dos testes, será calculada a porcentagem, velocidade e a sincronização de germinação e posteriormente a viabilidade das sementes testadas para realizar uma comparação entre sementes germinadas em meio aos extratos menos concentrados e as sementes germinadas em extratos mais concentrados. Os dados serão submetidos à análise de regressão linear e quadrática e ajustadas ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados esperados do presente projeto é uma baixa porcentagem de germinação nas sementes germinadas em contato com o aleloquímico.

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

CONTROLE DE MOSCA BRANCA (HEMIPTERA / ALEYRODIDAE) NA CULTURA DO REPOLHO COM USO DE EXTRATOS VEGETAIS"

DEBORA PACHECO RIBEIRO
ANA PAULA NUNES ZAGO OLIVEIRA

O combate da mosca-branca, se dá por alguns métodos, sendo o mais utilizado por meio dos inseticidas. O desenvolvimento de novos métodos para combater insetos considerados pragas é essencial. Os inseticidas extraídos a partir das plantas naturais possuem um custo menor, de simples manejo e preservam o meio ambiente. A importância desse estudo com a mosca-branca pode ser considerada, devido a grande quantidade de culturas que ela atinge, trazendo estragos significativos nas produções. Com a ajuda dos extratos vegetais, diminuir as perdas da agricultura. O estudo tem como proposta avaliar a eficácia de extratos vegetais utilizados como inseticidas naturais dentro da cultura do repolho. A população de moscas brancas (*B. Tabaci*) utilizadas no experimento será coletada na horta e tratadas no laboratório de Entomologia Agrícola da universidade, Será feita criação e alimentação diária dos insetos. Os tratamentos constarão das seguintes espécies vegetais: Casca da Jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lamark), e Noz moscada (*Myristica fragrans* Martinus Houttuyn), as aplicações serão feitas em doses de 3ml e 9ml + controle, em quatro repetições respeitando o período de 10 dias, os resultados serão verificados em 24h, 48h e 72h para verificar a mortalidade das moscas de cada aplicação. O presente trabalho está em andamento, apenas com resultados parciais, apresentados posteriormente. Em andamento

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

CARACTERIZAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO DO PACU (PIARACTUS MESOPOTAMICUS) JUVENIS E ADULTOS

VICTOR HUGO GARCIA DE OLIVEIRA
EDSON ASSUNÇÃO MARECO

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) apresenta excelentes características zootécnicas como rápido crescimento, parâmetro que está diretamente relacionado com o aumento da musculatura estriada esquelética. Pesquisas envolvendo a caracterização de genes musculares têm sido realizadas utilizando-se tecnologias moleculares, em espécies de peixes modelo como o Zebrafish que possuem o genoma sequenciado. No pacu, espécie que não possui o genoma sequenciado, esta falta de informação genética dificulta a realização de pesquisas relacionadas com a identificação das vias de sinalização que regulam o desenvolvimento, o crescimento e a manutenção do fenótipo muscular. Neste trabalho, pretendemos avaliar *in silico* as diferenças entre a musculatura de adultos e juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). De forma mais específica objetivamos I) obter sequências parciais e totais de genes expressos (transcriptoma) na musculatura do pacu; II) caracterizar os genes relevantes para o fenótipo muscular; III) avaliar os genes diferencialmente expressos em adultos e juvenis de pacu. O presente projeto tem como colaboração pesquisadores do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado esquelético (LBME), alocados no departamento de morfologia do instituto de Biociências de Botucatu - IBB/UNESP. Os dados de sequenciamento obtidos para a realização deste projeto, são oriundos do desenvolvimento do projeto intitulado como "Análise comparativa e integrativa do transcriptoma e microRNAoma do músculo esquelético de *Colossoma macropomum* (tambaqui), *Piaractus mesopotamicus* (pacu) e seu híbrido, tambacu: abordagens moleculares, *in silico*, *in vitro* e *in vivo*" As análises dos dados obtidos por meio dos sequenciamentos serão realizadas pelo Laboratório de Biologia de Músculo Estriado (LBME) com base em uma estrutura computacional de alto desempenho localizada no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu. Tal estrutura computacional baseia-se em máquinas com 64 gigabytes de memória e 24 núcleos de processamento. Em termos de software, os ambientes de processamento de dados se darão através do sistema operacional baseados em (Unix/GNU/Linux). Onde todos os programas utilizados para as análises de bioinformática serão baseados em distribuições livres. Os resultados obtidos serão analisados com o uso de alguns softwares específicos (técnicas de bioinformática). Com o presente projeto, espera-se obter resultados que possibilitarão estabelecer uma base sólida para o entendimento do desenvolvimento da expressão gênica em exemplares juvenis e adultos do pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA E MOLECULAR DE ESCHERICHIA COLI DIARREIOGÊNICA

MELISSA DE SOUZA SILVA
INAE DE OLIVEIRA GARCIA
ROBSON DIEGO SILVA GONCALVES
IRANILDO DO AMARANTE FERNANDES
LUCAS JOSE DA COSTA
ROGÉRIA KELLER
HERMANN BREMER NETO

INTRODUÇÃO A *E. coli* é composta por bacilos gram-negativos facultativos e anaeróbicos pertencentes à família Enterobacteriaceae. A espécie de *Escherichia coli* é a principal anaeróbia facultativa do intestino grosso de humanos e animais de sangue quente (GOMES et al., 2016). No entanto, existe uma variedade de cepas de *E. coli* que podem adquirir fatores de virulência, através da transmissão horizontal de genes, tornando-as patogênicas para humanos (BISCHOFF et al., 2005). A plasticidade genômica de vários isolados de *E. coli* fornece a capacidade de proliferar e sobreviver em uma série de ambientes (DEPAS; CHAPMAN; HUFNAGEL, 2015). A bactéria coloniza o trato gastrointestinal de bebês humanos logo após o nascimento e sua relação com o hospedeiro coexiste em uma boa saúde e possui benefício mútuo (KAPER et al., 2004). As cepas patogênicas de *E. coli* podem causar diarreia em varias espécies animais, inclusive no homem. As doenças diarreicas são um dos problemas de saúde mais importantes em diferentes lugares do mundo afetando a morte de milhares de pessoas incluindo crianças (KUBIAK-SZELIGOWSKA et al., 2016). A *E. coli* promove várias infecções humanas que podem ser classificadas como intestinal e extraintestinal (OBATA-YASUOKA et al., 2002). As *E. coli* diarreiogênicas (DEC) podem ainda serem classificadas em sete patótipos de acordo com suas características clínicas e fatores de virulência em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtoras de toxina Shiga (EHEC/STEC), *Shigella/ E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregante (EAEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* aderente invasiva (AIEC) (CROXEN et al., 2013). A EPEC é um dos mais importantes agentes etiológicos da diarreia aguda em crianças, sendo classificada como típica (tEPEC) ou atípica (aEPEC) conforme a presença ou ausência do plasmídeo do fator de aderência *E. coli* (pEAF) (BUERIS et al., 2015). Enquanto que a EIEC apresenta características bioquímicas, genéticas e patogênicas semelhantes às da *Shigella*, responsável pela invasão e destruição de células epiteliais de tecido, apresentando quadro clínico de diarreia aquosa, e na maioria dos casos evoluem para disenteria (CROXEN et al., 2013). Diferentemente da EPEC, a EHEC produz as toxinas Shiga 1 (Stx1) e 2 (Stx2) e, portanto, também é chamado de *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), que está associada a colite hemorrágica HC. Este

patótipo afeta intestino grosso e leva a dor abdominal intensa, onde a diarreia aquosa passa a evoluir para diarreia sanguinolenta causando então a síndrome hemolítica urêmica (TARR; GORDON; CHANDLER, 2005). Já a *E. coli* enteroagregante (EAEC), tem capacidade de formar biofilme na mucosa intestinal, além de produzir enterotoxinas que permite a adesão da bactéria ao epitélio do intestino (BOISEN; KROGFELT; NATARO, 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Sendo assim, atinge o intestino delgado e é responsável pela diarreia endêmica de lactentes em países industrializados e em desenvolvimento. (GOHAR et al., 2016; PATZI-VARGAS et al., 2015). As *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) são conhecidas como diarreia do viajante, porém pode provocar a mortalidade infantil, principalmente em países em desenvolvimento. Se caracterizam por sua capacidade de produzir toxinas termolábeis (LT) e/ou toxina termoestável (ST, incluindo dois subtipos, STh e Stp) (GAASTRA, 1996) afetando assim o intestino delgado. *E. coli* aderente e invasiva (AIEC) tem capacidade de aderir e invadir células epiteliais intestinais e sobreviver dentro de macrófagos. Sua aderência depende da expressão do pili tipo 1, das fímbrias polares longas e da presença do antígeno carcinoembrionário (CEACAM6) como receptor da célula hospedeira (KALITA; HU; TORRES, 2014). Já a *E. coli* difusamente aderente DAEC, são capazes de se ligarem as células, porém não se enquadram em padrões clássicos de aderência como as demais DEC (NATARO; KAPER, 1998). A *E. coli* é uma espécie extremamente receptiva à aquisição de DNA por meio de uma transferência horizontal de genes ("horizontal gene transfer"- HGT)". Esta característica permite com que a espécie tenha uma plasticidade genética que possa se refletir na formação dos grupos patogênicos intestinais e extraintestinais, referindo-se em todos esses grupos patogênicos, provavelmente a maioria dos genes que estão ligados diretamente com a virulência e carregados em elementos genéticos móveis como plasmídeos, bacteriófagos, transposons e ilhas de patogenicidade (PAIs). Como por exemplo, pode-se citar os plasmídeos de virulência dos patótipos de DEC (EAEC, STEC/ EHEC, ETEC), e o transposon de ETEC, a PAI LEE de EHEC e de EPEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Os estudos filogenéticos realizados com as populações de *E. coli* inicialmente revelaram que a população não era homogênea e a diversidade notada era clonal e permitia a organização de amostras em uma árvore filogenética, identificando assim, a ECOR (*E. coli* reference collection) (OCHMAN; SELANDER, 1984) As análises filogenéticas realizadas através da técnica de Multicoccus enzyme Eletrophoresis (MLEE) determinaram que as cepas de *E. coli* se divide em quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D). Esses filogrupos assumem diferentes nichos ecológicos, onde as cepas extra intestinais virulentas pertencem ao grupo B2 e em menor grau, ao grupo D, sendo ambos responsáveis por ocasionar infecções em sítios extra intestinais; enquanto as maiores das cepas comensais pertencem ao grupo A e B1 colonizando o intestino de humanos saudáveis. Essa análise até então era realizada pela técnica de MLEE ou ribotipagem, porém ambas as técnicas de referência são complexas e demoradas, além de requererem uma coleção de cepas tipadas (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Em 2000, Clermont et al, tornaram a análise filogenética de *E. coli* mais acessível com a introdução de uma metodologia baseada em uma PCR-triplex para determinar o padrão de amplificação de três marcadores, os genes *chuA* (receptor Heme), *yjaA* (proteína de função desconhecida) e o fragmento anônimo *TspE4.C2*, cuja precisão relaciona-se com os grupamentos filogenéticos detectados pela técnica do MLEE (CLERMONT; BONACORSI; BINGEN, 2000). Desde então, os dados desta metodologia possibilitaram validar de forma mais efetiva a aplicação do método de PCR tripléx para a atribuição do grupo Filo (GORDON et al., 2008), que se baseia em um processo de

multiplicação de um trecho específico do DNA (gene ou parte dele, regiões supervariáveis, DNA, etc.) utilizando o desoxinucleotídeos como monômeros. Sendo assim, é possível detectar grupos crípticos de *Escherichia* (I a V) que são amostras bioquimicamente idênticas a *E. coli*, mas geneticamente distintas, além disto, pode se notar a existência de novos filogrupos (WALK et al., 2009). O método de tipagem passa a ser aprimorado permitindo a abrangência de novos grupos filogenéticos existentes dentro da espécie de *E. coli*. Sendo assim, foi proposto o método de PCR-quadriplex que inclui um quarto marcador, o gene *arpA* (regulador da sintetase de acetil Coa). Além disso, foram introduzidos marcadores extras para a classificação de novos grupos filogenéticos C e E. Com esse novo método é possível classificar as cepas dessa bactéria dentro de um dos setes grupos filogenéticos distinto (A, B1, B2, C, D, E e F) ou dentro de um dos cinco clados de *Escherichia* (clado I a V) e assim poder classificar as amostras de forma acurada. A relação entre os clones patogênicos e grupos filogenéticos não é separado, havendo então ocorrência de cepas tanto patogênicas quanto não patogênicas em qualquer dos grupos filogenéticos descritos (TENAILLON et al., 2010). A inclusão do *arpA* no método de PCR-quadriplex possui duas finalidades. Em primeiro lugar, esse regulador atua como um controle interno para a qualidade do DNA, sendo responsável como uma adição de todas as estirpes de *E. coli* e Clado I onde devem produzir pelo menos um produto usando o PCR. Em segundo, a inclusão de *arpA* permite que as cepas pertencentes do filo F (anteriormente identificadas como cepas D) possa distinguir o porquê da *arpA* estarem presentes em todas as *E. coli* com exceção de cepas pertencentes ao Filo B2 (CLERMONT; BINGEN, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

Embora haja tratamentos econômicos e eficazes para diarreia, essa doença é a segunda causa de morte no mundo, onde cerca de 88% das mortes ocasionadas por ela são atribuídas à má qualidade da água, saneamento inadequado e falta de higiene (WARDLAW et al., 2010). Na região de Presidente Prudente não há estudos relacionados sobre a DEC (*Escherichia coli* diarreio gênicas) e sua prevalência nos casos de diarreia em crianças. Nem tampouco estudos que permitam estender os conhecimentos atuais sobre a distribuição filogenética de forma generalizada de amostras de DEC na região do Oeste Paulista e Alta Paulista de São Paulo. Sendo assim fazem-se necessários estudos para avaliar a filogenia desse patógeno como potencial agente causador de diarreia para que ações de saúde pública sejam efetivadas.

3.0 OBJETIVO GERAL

Estudar a filogenia dos patótipos de *E. coli* diarreio gênicos isolados de crianças com diarreia aguda na região da Alta Paulista e do Oeste Paulista de São Paulo.

3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar a origem filogenética das cepas de *E. coli* através no novo método de PCR-quadriplex, através dos marcadores *chuA*, *yjaA*, *arpA*, e o fragmento *TspE4.C2*.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo será realizado entre maio de 2018 a maio de 2019 no Laboratório de Microbiologia e Imunologia UNOESTE na cidade de Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

4.1 Obtenção das amostras

Serão utilizadas amostras de criança menores de cinco anos com quadros de diarreia aguda atendidas por Laboratórios públicos e privada da região do Oeste Paulista e da Alta Paulista. Assim que *E. coli* for isolada por esses laboratórios colaboradores essas serão encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da UNOESTE onde serão re-isoladas e checadas em testes bioquímicos convencionais (PROBAC do BRASIL) segundo recomendações do fabricante.

4.2 Obtenção do DNA molde

Os isolados de *E. coli* serão cultivados em 3 mL de TSB e conseqüentemente serão incubados a 37°C por cerca de 18h. A seguir será feito um repique em meio TSA e novamente serão incubadas para o crescimento a 37°C por cerca de 18h. O DNA molde será obtido a partir do raspado contendo cerca de 5 colônias isoladas da placa de TSA e dissolvida em 200 µl de água bidestilada esteril. A suspensão bacteriana será

submetida á fervura por 10 min seguida de centrifugação em microcentrifuga a 12.000 rpm por 1 min. O sobrenadante deste material será utilizado como DNA molde, sendo mantido congelado a -20°C até o momento do uso.

4.3 Determinação da origem filogenética das amostras A determinação do grupo filogenético das linhagens será realizada através do PCR-quadruplex, segundo CLERMONT et al. (2013). Para a classificação dessas amostras, primeiramente é realizado o PCR quadruplex para os genes chuA, yjaA e arpA e para fragmento TspE4.C2, onde o padrão de amplificação obtido na quadruplex permite a classificação definitiva (para os grupos A, B1, B2 e F) ou parcial das amostras (grupos A ou C, D ou E, clado I) (tabela 1), sendo que no caso da classificação parcial, uma segunda PCR, especifica é realizado posteriormente para classificar definitivamente as amostras.

4.4 Reação de PCR quadruplex para determinação do grupo filogenético. As reações serão amplificadas no termociclador Mastercycle gradient (Eppendorf) utilizando microtubos de 0,5 mL (Axygen - USA) e volume final de 50 ul. Essas reações serão preparadas com a utilização de Go Taq Green Master Mix 1x (PROMEGA - USA), 1 ul de DNA molde, água bidestilada estéril em volume necessário para completar 50 ul e iniciadores específicos (Tabela 2), sendo que utilizaremos 20 pmol de cada um dos iniciadores com exceção do par de iniciadores de arpA que se utilizará 40 pmol de cada nas reações. Para a quadruplex e para as reações especifica para o filogruppo C a amplificação será realizada utilizando as seguintes condições: 94 °C por 4 min, seguida de 30 ciclos de amplificação de 94°C por 5 seg e 59°C por 20 seg, com extensão final de 72°C por 5 min. O PCR especifica para o filo grupo E irá ser realizado utilizando a condição de amplificação de 94°C por 4 min, seguida de 30 ciclos de amplificação de 94°C por 5 seg e 57°C por 20 seg, com extensão final a 72°C por 5 min.

4.5 Eletroforese em gel de agarose Após amplificação, os produtos serão submetidos á eletroforese em gel de agarose a 2%. Os géis serão preparados com a utilização de agarose fundida a quente, em tampão Tris- Borato-EDTA 0,5X (TBE). Essas amostras serão preparadas para a eletroforese com a adição de 5 uL de corante de corrida 5X, e 10 microlitos da reação será submetida a eletroforese, sendo assim, tendo um marcador de peso molecular foi utilizado o " 1 kb Plus DNA Ladder" (Invitrogen).

4.6 Forma de Análise dos resultados A classificação das amostras será realizada pela analise do padrão de amplificação das mesmas a partir do PCR-quadruplex, permitindo a classificação parcial ou definitiva das amostras conforme mostrado na Tabela 1. No caso da classificação definitiva, nenhum passo adicional será necessario, já para o caso da classificação parcial a amostra deverá ser submetida a uma segunda PCR especifica conforme descrito na Tabela 1. Ainda não obtivemos resultados, portanto não temos discussão e conclusão Ainda não obtivemos resultados, portanto não temos discussão e conclusão

Zoologia

Pesquisa

Apresentação Oral

UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA - UNOESTE

Ciências Biológicas

Zoologia

LEVANTAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COLEÓPTEROS COM O USO DE ARMADILHA MALAISE EM FRAGMENTO DE MATA ESTACIONAL

MARIA YASMIM FRANCO PEREIRA
ANA PAULA NUNES ZAGO OLIVEIRA
NIKOLAS CORDEIRO PEREZ ALVES
PABLO EDINI DAMIÃO EDINE DAMIÃO

Os artrópodes são o grupo mais diverso do planeta, tendo a classe Insecta como mais representativa, contando com mais de um milhão de espécies identificadas, sendo que este número vem aumentando a cada ano. A ordem coleoptera é conhecida por sua abundante riqueza de indivíduos, havendo aproximadamente 350.000 espécies terrestres descritas, conhecida popularmente como Besouros, com seus indivíduos presentes em quase todos níveis tróficos desempenhando diversas funções no ecossistema, como polinização, controle biológico, ciclagem de nutrientes e bioindicadores, além de atuarem na área forense e servirem de recurso alimentar para outras espécies. Este estudo tem como objetivo demonstrar a diversidade de famílias de Coleópteros presentes no fragmento de Mata Atlântica. A pesquisa está sendo realizada no fragmento de Mata Estacional Semidecidual presente no Campus II da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) localizada no município de Presidente Prudente - SP. A coleta é de forma passiva utilizando a armadilha do tipo Malaise, devido a sua forma que de tenda que permite a captura de insetos voadores interceptando seu voo. Na Malaise contém um frasco retrátil com solução aquosa em que os insetos são atraídos e armazenados, sendo as coletas feitas quinzenalmente. Todo material é triado em nível de família com auxílio de chave dicotômica e lupa estereoscópica. O trabalho se deu início em Maio de 2018 e até o momento foram coletados 2.776 indivíduos pertencentes a ordem Coleoptera, divididos em 16 famílias, sendo que Chrysomelidae, Elateridae e Curculionidae são aquelas com maior abundância de indivíduos. Como resultados parciais, foram encontradas 16 famílias pertencentes a ordem coleóptera, dentre estas, as famílias em destaque são Chrysomelidae, Elateridae e Curculionidae. entre as 16 famílias, são encontradas espécies do macro ao micro, terrestres e aquáticos.

Presidente Prudente, 18 de maio de 2019

