



I SIMPÓSIO
JOVENS
CIENTISTAS
DO IOC

07 e 08
nov. 2013

Livro de resumos

APRESENTAÇÃO

Da aplicação nanotecnológica para a vetorização de fármacos a estudos relacionados a doenças neurodegenerativas. Da avaliação do efeito inibitório de moléculas marinhas sobre o vírus Influenza A ao estudo das populações de *Aedes aegypti* no Rio de Janeiro. Em cada página deste Caderno de Resumos é possível perceber a complexidade e a heterogeneidade das pesquisas produzidas no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). É possível identificar nestes jovens cientistas (recentemente incorporados ao quadro da Instituição), a paridade da ciência e da inovação presentes nos laboratórios do IOC com o compromisso de contribuir para a saúde e para a ciência.

Sob outra perspectiva, este livreto representa, ainda, a memória do I Simpósio Jovens Cientistas do IOC, uma iniciativa que busca divulgar para toda a comunidade do Instituto, as atividades desenvolvidas pelas gerações de pesquisadores e tecnologistas recém chegados.

Desejamos a todos um excelente Simpósio, e esperamos que esta iniciativa gere novas cooperações entre diferentes laboratórios da Casa.

Wilson Savino
Diretor do IOC

PROGRAMAÇÃO

07 de novembro de 2013

Local: Anfiteatro do Museu da Vida

Recepção | 8h30 - 9h

Sessão de Abertura | 9h – 9h30

Mesa Redonda I

Novas tecnologias aplicadas às ciências da Saúde (9h30 - 11h30)

Moderador: Floriano Paes

Josué da Costa Lima-Junior (9h30 – 10h)

Potencial antigênico e imunogênico de antígenos lineares sintéticos contendo epítopos de células B e T das proteínas de superfície de merozoítos (PvMSP-1, PvMSP-9 e PvAMA-1) e esporozoítos (PvCSP) de *Plasmodium vivax*

Andressa Bernardi (10h – 10h30)

Aplicação da Nanotecnologia para vetorização de fármacos

Pausa café (10h30 – 11h)

Milene Miranda Accioly de Mesquita (11h – 11h30)

Avaliação e determinação do efeito inibitório de moléculas derivadas de microrganismos marinhos sobre os vírus Influenza A

Conferência e debate | 11h30 – 12h30

Debatedor: Milton Ozório Moraes

Elisa Cupollilo

Inserção de jovens cientistas em Programas de Pós-graduação

Almoço | 12h30 – 14h

Mesa Redonda II

Bioquímica aplicada à Saúde | 14h – 15h30

Moderador: Hugo Caire de Castro Faria Neto

Francisco Gomes Neto (14h – 14h30)

A estrutura, dinâmica e atividade da DM43, uma proteína inibidora natural de metaloproteinase do plasma de *Didelphis marsupialis* por espectroscopia de RMN em solução e Simulação de Dinâmica Molecular

Rafael Ferreira Dantas (14h30 – 15h)

Avaliação do efeito de compostos 1H-1, 2, 3-triazólicos sobre a atividade de glicosidases comerciais

Pausa café | 15h – 15h30

Mesa Redonda III

Imunopatologia de infecções | 15h30 – 16h30

Moderadora: Alda Maria da Cruz

Fernanda N. Morgado (15h30 – 16h)

Estudo imunopatológico do baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*: Qual o mecanismo responsável pela falha no controle da carga parasitária?

Fernanda Heloíse Côrtes (16h – 16h30)

Avaliação do perfil de resposta imune em indivíduos infectados pelo HIV-1 com diferentes níveis de controle da replicação viral

08 de novembro de 2013

**Local: Anfiteatro Emmanuel Dias
(Pavilhão Arthur Neiva)**

**Mesa Redonda IV | 10h – 11h
Genética de Populações e
Epidemiologia Molecular**

Moderadora: Ana Carolina Paulo
Vicente

Renata Schama Lellis (10h – 10h30)
**Estruturação das populações de *Aedes
aegypti* no Rio de Janeiro – um estudo
preliminar para a implementação do
programa ‘Eliminate Dengue’ no Brasil**

Gonzalo José Bello Betencor (10h30 –
11h)

**Origem e dinâmica de disseminação do
HIV-1 subtipo C no Brasil**

Pausa café | 11h – 11h30

**Mesa Redonda V | 11h30 – 12h30
Educação e Divulgação Científica**

Moderadora: Maurício Luz

Anna Cristina Calçada Carvalho (11h30
– 12h)

**Avaliação de novas tecnologias
educativas, diagnósticas e de gestão
de serviços no controle da tuberculose
no município do Rio de Janeiro**

Barbara Dias (12h – 12h30)

**Coleção de Febre Amarela do IOC: um
patrimônio a serviço da ciência, saúde
e sociedade**

Almoço | 12h30 – 13h30

Mesa Redonda VI

**Doenças genéticas e crônico-
degenerativas (13h30 – 14h30)**

Moderador: Pedro Cabello

Mário Campos Junior (13h30 – 14h)

**Mutações e variações no número de
cópias gênicas como causas, fatores de
risco ou moduladores das doenças
neurodegenerativas**

Fernando Regla Vargas (14h30 – 15h)

**Aspectos genéticos no câncer
hereditário, tumores sólidos
pediátricos, malformações congênitas,
doenças neurodegenerativas e do
neurodesenvolvimento**

Conferência e debate | 15h – 16h

Debatedor: Rodrigo Stabeli

Hugo Caire de Castro Faria Neto

**Inserção de jovens cientistas em
Projetos e Redes de Pesquisa**

Sessão de encerramento | 16h – 16h30

SUMÁRIO

Ana Carolina Ramos Guimarães - **Identificação de substâncias citotóxicas contra parasitas patogênicos: abordagens *in silico* e *in vitro*** – pg. 06.

Andressa Bernardi - **Aplicação da Nanotecnologia para vetorização de fármacos** – pg. 08.

Anna Cristina Calçada Carvalho - **Avaliação de novas tecnologias educativas, diagnósticas e de gestão de serviços no controle da tuberculose no município do Rio de Janeiro** – pg. 10.

Barbara Cristina E. P. Dias de Oliveira - **A Coleção de Febre Amarela do IOC: um patrimônio a serviço da ciência, saúde e sociedade** – pg. 11.

Daniele Pereira de Castro - **Resposta imune de *Rhodnius prolixus* frente à infecção por *Trypanosoma cruzi*: função de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na interação parasita, vetor e microbiota** – pg. 13.

Felipe Ferraz Figueiredo Moreira - **Taxonomia e Biologia dos Triatomíneos (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil** – pg. 15.

Fernanda Heloise Côrtes - **Avaliação do perfil de resposta imune em indivíduos infectados pelo HIV-1 com diferentes níveis de controle da replicação viral** – pg. 17.

Fernanda N. Morgado - **Estudo imunopatológico do baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*: Qual o mecanismo responsável pela falha no controle da carga parasitária?** – pg. 19.

Fernando Regla Vargas - **Aspectos genéticos no câncer hereditário, tumores sólidos pediátricos, malformações congênitas, doenças neurodegenerativas e do neurodesenvolvimento** – pg. 22.

Frederico Rogério Ferreira - **Investigação de fatores genéticos, ambientais e neuromodulatórios na etiologia de distúrbios neuropsiquiátricos** – pg. 24.

Gonzalo José Bello Betencor - **Origem e dinâmica de disseminação do HIV-1 subtipo C no Brasil** – pg. 25.

Josué da Costa Lima-Junior - **Potencial antigênico e imunogênico de antígenos lineares sintéticos contendo epitopos de células B e T das proteínas de superfície de merozoítos (PvMSP-1, PvMSP-9 e PvAMA-1) e esporozoítos (PvCSP) de *Plasmodium vivax*** – pg. 26.

Josué da Costa Lima-Junior - **Recombinant Modular Chimeras of *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Protein-1 (PvRMC-RBP1): IgG antibodies profile in *P. vivax* exposed population from Amazon region – pg. 28.**

Leandro Batista das Neves - **Análise comparativa dos perfis de reconhecimento de soros do sul do Brasil para hidatidose no immunoblot – pg. 29.**

Marcos César Lima de Mendonça - **Construção de bibliotecas genômicas, para descrição do viroma do soro de pacientes com indicação clínica Dengue ou Febre Amarela, previamente testados com resultado negativo para estas – pg. 30.**

Mário Campos Junior - **Mutações e variações no número de cópias gênicas como causas, fatores de risco ou moduladores das doenças neurodegenerativas – pg. 32.**

Milene Miranda Accioly de Mesquita - **Avaliação e determinação do efeito inibitório de moléculas derivadas de microrganismos marinhos sobre os vírus Influenza A – pg. 34.**

Nayhanne Tizzo - **RNA Interferente como ferramenta para supressão do vírus da hepatite B – pg. 36.**

Otacilio da Cruz Moreira - **Ecto-NTPDases como fatores de virulência de tripanosomatídeos – pg. 37.**

Rafael Ferreira Dantas - **Avaliação do efeito de compostos 1H-1,2,3-triazólicos sobre a atividade de glicosidases comerciais – pg. 39.**

Renata Schama Lellis - **Estruturação das populações de *Aedes aegypti* no Rio de Janeiro – um estudo preliminar para a implementação do programa ‘Eliminate Dengue’ no Brasil – pg. 40.**

Renata Schama Lellis - **Estruturação das populações de *Aedes aegypti* no Brasil e sua implicação no controle populacional do vetor – pg. 41.**

Renata Schama Lellis - **Abordagem Bioinformática para o estudo da resistência a inseticidas em insetos vetores – pg. 42.**

Tulio Machado Fumian - **Produção de anticorpos IgY anti-norovírus utilizando *virus-like particles* para desenvolvimento de ensaio imuno-enzimático *in house* – pg. 43.**

Identificação de substâncias citotóxicas contra parasitas patogênicos: abordagens *in silico* e *in vitro*

Ana Carolina Ramos Guimarães - Laboratório de Genômica Funcional e
Bioinformática/IOC/Fiocruz

O estudo da reconstrução metabólica em diversos organismos expõe compostos cruciais para a sua sobrevivência. Dentre estes estão às enzimas, responsáveis pela catálise das reações bioquímicas em vias metabólicas. Diferentemente das enzimas homólogas, as enzimas análogas (também conhecidas como enzimas isofuncionais não homólogas) são capazes de catalisar as mesmas reações, mas sem apresentar similaridade de sequência significativa no nível primário e, possivelmente, com diferentes estruturas tridimensionais. Um estudo detalhado destas enzimas pode desvendar novos mecanismos catalíticos, adicionar informações sobre a origem e evolução de vias bioquímicas e revelar alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas.

Para muitas enfermidades causadas por parasitas, as opções terapêuticas permanecem ineficientes ou inexistentes, exigindo a busca de novos alvos. Estes podem ser proteínas específicas do parasita ausentes no hospedeiro ou compostos presentes em ambos, mas com estrutura tridimensional substancialmente diferente, como as enzimas análogas. A abordagem usual empregada para busca de novos alvos terapêuticos leva em consideração a presença de compostos específicos do parasita que não estejam presentes no hospedeiro. A abordagem utilizando a metodologia empregada no AnEnPi (<http://bioinfo.pdtis.fiocruz.br/AnEnPi/>, Otto *et al.*, 2008), capaz de identificar, anotar e comparar enzimas homólogas e análogas, foi desenvolvida e utilizada para reconstruir computacionalmente as vias metabólicas de alguns organismos modelo, como por exemplo, os tripanossomatídeos. Esta metodologia também propiciou a identificação de compostos, no caso enzimas, que estão presentes tanto no hospedeiro quanto no parasita, mas por serem oriundos de ancestrais diferentes, possuem estrutura tridimensional diferenciada, sendo considerados compostos importantes para o estudo de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de novas drogas contra parasitas, uma vez que bloqueando estes compostos no parasita, a estrutura tridimensional do hospedeiro não sofreria alteração.

Uma análise mais focada no metabolismo de aminoácidos de *Trypanosoma cruzi* (Guimarães *et al.*, 2008) identificou alvos promissores para o desenvolvimento de novas drogas. Além disso, uma revisão do metabolismo geral de *T. cruzi* foi realizada em outras vias metabólicas, levando em consideração esta nova abordagem de busca por potenciais alvos terapêuticos (Alves-Ferreira *et al.*, 2009). Uma vez que a estrutura tridimensional é importante no estudo de analogia, a ferramenta MHOLline (<http://www.mholline.Incc.br/>) foi utilizada para a obtenção de modelos 3D a partir de

homólogos, análogos e proteínas específicas de *T. cruzi* versus *Homo sapiens*. As estratégias utilizadas nesse estudo apoiam o conceito de análise estrutural, juntamente com a análise funcional de proteínas, como uma interessante metodologia computacional para detectar potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas (Guimarães *et al.*, 2010). Alguns alvos selecionados estão sendo utilizados para ensaios de busca de inibidores enzimáticos por acoplamento (*docking*), dinâmica molecular, e cálculo de energia de ligação *in silico*, para posteriormente serem incluídos em testes de avaliação do efeito inibidor dos compostos selecionados por complementação heteróloga em levedura. Este último item permite desenvolver ensaios de larga escala (*high throughput screening*) para avaliar o efeito inibidor associado com os compostos ensaiados diretamente ao nível da enzima considerada como alvo molecular. Desta forma pretendemos contribuir para estabelecer estratégias mais racionais e eficazes para a identificação de novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de uma quimioterapia antiparasitária.

Análises com outros organismos estão sendo realizadas a fim de identificar alvos moleculares para o desenvolvimento de novas drogas contra doenças causadas por patógenos utilizando a abordagem baseada na busca de análogos funcionais e enzimas específicas dos parasitas.

Palavras-chave: Enzimas análogas, alvos moleculares, desenvolvimento de fármacos, modelagem molecular, *docking*, dinâmica molecular.

Aplicação da Nanotecnologia para vetorização de fármacos

Andressa Bernardi - Laboratório de Inflamação/IOC/Fiocruz

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar da ciência aplicada e tem se tornado uma área prioritária na pesquisa científica e no desenvolvimento tecnológico nos últimos anos. O termo nanotecnologia refere-se à capacidade de medir, desenhar e manipular materiais na escala atômica, molecular e supramolecular, a fim de compreender, criar e aplicar estruturas e sistemas com funções específicas atribuídas a seu tamanho.

Classicamente, a nanotecnologia aplica os princípios da engenharia, da eletrônica, da física e das ciências dos materiais na produção de sistemas nanoestruturados com tamanho compreendido na faixa entre 1 e 100 nm, mas muitas vezes é estendido para incluir materiais com tamanho inferior a 1 μm .

O objetivo essencial da nanotecnologia é reunir nanopartículas e integrá-las em estruturas ordenadas de forma a obter materiais úteis. A nanotecnologia tem sido empregada por diversos setores industriais com múltiplas aplicações, entre as quais se destacam as áreas de sistemas de armazenamento eletrônico, da biotecnologia e de carreadores de genes e de fármacos. A maioria dos nanomateriais atuais pode ser organizada em quatro tipos: materiais baseados em carbono; materiais baseados em metais; polímeros e dendrímeros; e compósitos.

Os avanços na nanotecnologia têm levado ao desenvolvimento de novos nanomateriais cujas propriedades físico-químicas diferem dos seus homólogos maiores devido à sua maior relação superfície/volume, tornando-os excelentes candidatos para aplicações biomédicas. O emprego da nanotecnologia tem levado a abordagens inovadoras em diversas áreas da medicina. Suas aplicações na triagem, diagnóstico e tratamento de doenças são coletivamente referidas como nanomedicina, constituindo um campo emergente e com potencial para revolucionar a área da saúde. Com o emprego de nanopartículas é possível fornecer terapia em um nível molecular, tratando a doença e aumentando a nossa compreensão sobre a sua patogênese.

O impacto da nanotecnologia na medicina pode ser observado principalmente nos métodos de diagnóstico, nas técnicas de entrega de fármacos e na medicina regenerativa. Métodos de diagnóstico são essenciais para a detecção precoce de doenças e para seu tratamento imediato, minimizando os possíveis danos ao resto do organismo. Técnicas de diagnóstico baseado no uso de nanopartículas oferecem maior sensibilidade e auxiliam na detecção precoce da doença, oferecendo um melhor prognóstico e uma maior possibilidade de sucesso do tratamento. Medicamentos convencionais apresentam limitação, principalmente devido aos seus efeitos adversos, resultado da falta de especificidade da sua ação e da falta de eficácia, devido a doses inadequadas ou ineficazes, como é o caso da quimioterapia. Dessa forma, a nanotecnologia oferece a possibilidade de projetar novos medicamentos com maior especificidade celular e sistemas de liberação de fármacos que atuam seletivamente em alvos específicos, além de protegê-los da degradação. Isso permite a administração de doses menores porém mais eficazes, minimizando efeitos adversos. A nanotecnologia também pode ser utilizada para aperfeiçoar formulações de medicamentos, aumentando a solubilidade de um fármaco e alterando sua farmacocinética, promovendo uma

liberação sustentada e, aumentando assim, a sua biodisponibilidade. As diversas plataformas da nanotecnologia podem ser utilizadas para o desenvolvimento de terapias mais sofisticadas, como o direcionamento de um fármaco para uma célula-alvo e a possibilidade de combinação de diferentes fármacos em um único nanocarreador promovendo uma terapia sinérgica.

Neste contexto, como Pesquisadora recém ingressa no Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), pretendo implementar minhas linhas de pesquisa aplicando a nanotecnologia como ferramenta para a vetorização de fármacos nas áreas estratégicas de pesquisa da FIOCRUZ, bem como na vetorização de fármacos para o sistema nervoso central, uma vez que toda a minha formação foi focada na neurociências.

O laboratório no qual estou inserida, Laboratório de Inflamação, tem sua pesquisa centrada na farmacologia básica e aplicada, tendo seus esforços concentrados em estudos pré-clínicos visando à descoberta de novos agentes terapêuticos para doenças pulmonares, dentre elas a asma. A asma constitui importante desafio para a medicina em função dos elevados e crescentes custos sociais e econômicos observados no Brasil e em vários outros países do mundo. A ausência de um tratamento seguro tem reunido esforços na busca por novas alternativas que visem não apenas reduzir o impacto da doença nos custos sociais, mas que possibilitem melhor qualidade de vida aos pacientes. Neste cenário, a nanotecnologia desempenha um importante papel no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas.

Para o desenvolvimento e a caracterização físico-química dos nanocarreadores, até o estabelecimento de uma plataforma nanotecnológica na FIOCRUZ, tenho mantido colaboração com o grupo de pesquisa no qual tive minha formação, coordenado pela Profa. Sílvia Guterres na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Dessa forma, a estratégia geral dos projetos que atualmente coordeno na FIOCRUZ visam o desenvolvimento de nanopartículas inovadoras para vetorização de fármacos e a investigação do potencial efeito farmacológico dessas formulações em doenças pulmonares. Os principais objetivos destes projetos são: (i) desenvolver e caracterizar nanopartículas contendo os diferentes fármacos e/ou novos compostos para investigação farmacológica nos modelos experimentais de doenças pulmonares; (ii) nanoencapsular fármacos já utilizados em doenças pulmonares, mas que possuem farmacocinética desfavorável e/ou elevada toxicidade visando a melhoria destes parâmetros; (iii) nanoencapsular substâncias de origem natural, visando a busca de agentes alternativos que possam controlar essas doenças de forma mais eficaz e segura. Nossos sistemas de avaliação estão essencialmente baseados em ensaios já padronizados como: (i) preparo das nanopartículas pela técnica de deposição interfacial de polímeros degradáveis; (ii) determinação de parâmetros físico-químicos (diâmetro, polidispersão, potencial zeta, morfologia) e estabilidade dessas formulações; (iii) avaliação de mecanismos celulares e moleculares em sistemas isolados e teciduais; (iv) avaliação da hiperreatividade de vias aéreas; (v) análise de alterações na fisiologia pulmonar; (vi) análise do infiltrado leucocitário no lavado broncoalveolar; (vii) avaliação de alterações de remodelamento pulmonar; bem como (viii) análise dos mediadores inflamatórios envolvidos.

O estabelecimento desta nova linha de pesquisa de caráter multidisciplinar possibilitará o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, bem como a difusão do conhecimento e a experiência científica adquirida de forma abrangente, atendendo às necessidades de ensino, extensão e pesquisa da FIOCRUZ.

Avaliação de novas tecnologias educativas, diagnósticas e de gestão de serviços no controle da tuberculose no município do Rio de Janeiro

Anna Cristina Calçada Carvalho - Laboratório de Inovação em Terapias, Ensino e Bioprodutos/IOC/Fiocruz

A tuberculose (TB) mantém-se como uma das principais doenças infecciosas nos Países em desenvolvimento. Apesar dos avanços obtidos nas últimas décadas no controle da TB no País, o Brasil ainda se encontra na lista dos 22 Países com maior carga da doença no mundo, cerca de 70 mil casos da doença são registrados todos os anos e a taxa de abandono do tratamento supera os 20% em várias cidades. Nesse cenário, as classes mais pobres da população são aquelas mais vulneráveis à doença, enquadrando a tuberculose entre as sete doenças prioritárias do Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Doenças Negligenciadas do Ministério da Saúde. Inovações na área de TB têm sido enfatizadas e propostas pela Organização Mundial da Saúde e por programas governamentais de diversos Países. Globalmente, as intervenções na área da saúde são cada vez mais avaliadas não apenas quanto à possibilidade de produzir efeitos benéficos, mas também em estudos que possam amparar uma tomada de decisão. No presente projeto, fruto da colaboração entre o Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos (LITEB) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) com a Unidade de Pesquisa em Tuberculose do Programa Acadêmico em Tuberculose da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro e com a Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro (subprojetos 1 e 2) e Universidade de Brescia e Laboratório de Microbiologia Celular do IOC (subprojeto 3) serão avaliadas novas tecnologias para o controle da TB que envolvem âmbitos diversos da doença, mas igualmente prioritários: impacto da implementação da Estratégia de Saúde da Família (ESF) nas ações de controle da TB, intervenção educativa para o aumento da aderência ao tratamento de pacientes e seus contatos e biomarcadores da resposta imune a diferentes antígenos micobacterianos. Tais estudos têm como objetivo oferecer informações mais precisas e métodos mais eficazes para uma melhor gestão diagnóstica e terapêutica dos casos de TB no Sistema Único de Saúde, com particular atenção à redução da taxa de abandono do tratamento anti-TB nas populações socialmente mais vulneráveis.

A Coleção de Febre Amarela do IOC: um patrimônio a serviço da ciência, saúde e sociedade

Barbara Cristina E. P. Dias de Oliveira e Marcelo Pelajo Machado - Coleção de Febre Amarela - Laboratório de Patologia/IOC/Fiocruz

As Coleções Científicas de material biológico pertencentes a Museus, Centros de Ciência e Institutos de Pesquisa constituem tanto o banco de dados do conhecimento gerado pela pesquisa pregressa quanto ferramenta para pesquisas atuais e futuras. Essas pesquisas são realizadas sob novos olhares resultantes do acúmulo do conhecimento científico gerado ao longo dos anos ou pelo desenvolvimento de novas tecnologias que permitem esclarecimentos de pontos ainda duvidosos ou não totalmente elucidados. A importância dada às Coleções Científicas para a reconstrução histórica da atuação dos cientistas como atores sociais está centrada no fato de existir nas coleções e nos centros de referência um acervo material, bibliográfico e arquivístico que sedimenta a memória documental relativa às tradições de pesquisa de mais de um século em várias áreas do conhecimento como botânica, zoologia, microbiologia e patologia. Nesse sentido, a Coleção de Febre Amarela do IOC (CFA) vem promovendo diversas ações nas vertentes de Patrimônio, Pesquisa, Desenvolvimento Tecnológico, Ensino e Difusão e Popularização da Ciência, visando cumprir seu papel científico, cultural e social. Em relação ao Patrimônio, o acervo biológico da Coleção de Febre Amarela do Instituto Oswaldo Cruz (CFA) é composto de fragmentos de fígado humano coletados por viscerotomia e fixados em formol, com respectivos blocos parafinados e preparados histológicos corados, oriundos de 498.000 casos suspeitos de Febre Amarela entre as décadas de 1930 e 1970, durante as campanhas de combate à doença. O acervo documental encontra-se sob a guarda da Casa de Oswaldo Cruz e é constituído por protocolos, imagens e descrição de doença. A equipe atua nessa vertente através do Programa Permanente de Salvaguarda do Acervo e do Programa de Digitalização Continuada do Acervo da CFA. Além do Patrimônio, a equipe de trabalho está atuante também na pesquisa e no desenvolvimento tecnológico através da: a) reavaliação do diagnóstico de casos interessantes ou de etiologia indefinida; b) análise dos documentos que compõem o acervo para alimentação do Banco de Dados da CFA e para compilação dos mesmos para as atividades de pesquisa; c) realização de estudo molecular com o material da CFA, visando também à obtenção de RNAs amplificáveis, para a busca de outras infecções virais e parasitárias que possam estar associadas ao material.

Este estudo está dividido em duas fases; a primeira contempla uma análise histopatológica e molecular de embriões de galinha utilizados na produção da vacina contra FA, onde buscamos as melhores alternativas metodológicas para extração e amplificação de ácidos nucleicos em tecidos animais formolizados e embebidos em parafina. A segunda envolve o teste da(s) metodologia(s) selecionada(s) no material da CFA e a implantação da melhor alternativa metodológica em nosso Laboratório. Para tanto, utilizamos material proveniente de embriões de galinha infectados experimentalmente, fixado em formalina e incluído em parafina. A análise histológica e

imuno-histológica deste material têm demonstrado alterações interessantes embora aparentemente inespecíficas no embrião infectado. Entre elas é possível destacar a hiperplasia hematopoética que parece estar relacionada com concomitante aceleração do processo de angiogênese no interior de moldes cartilagosos que precede o início da migração de células imaturas para a constituição da medula óssea. Neste trabalho, foram testados três diferentes protocolos para extração de RNA, descritos em literatura (protocolos “in house”) e kits comerciais. Com os resultados obtidos até o momento foi possível demonstrar que: (1) a extração de RNA a partir do material da CFA é possível mesmo nos casos que datam da década de 1930, teoricamente de execução técnica mais complexa, devido à ausência de tamponamento da formalina e da idade do material; (2) mesmo em patologias hepáticas degenerativas graves, onde ocorre importante redução do parênquima hepático, é possível a extração de RNA; (3) os kits comerciais apresentaram uma melhor quantidade e qualidade de RNA extraído quando comparado com os protocolos “in house” previamente testados e (4) a extração de RNA proveniente do material da infecção experimental apresenta melhor rendimento que os obtidos da CFA, fato que pode ser justificado devido à ausência de tamponamento da formalina, o tempo de emblocamento e a qualidade da parafina da época. Na vertente Difusão e Popularização da Ciência, temos traçado estratégias de disponibilização permanente tanto das informações contidas no acervo como também de conceitos e fazeres inerentes à nossa área de conhecimento. Estas estratégias contemplam a realização de oficinas com atividades lúdicas nos eventos “Fiocruz pra Você” e “Semana Nacional de Ciência e Tecnologia”, bem como o desenvolvimento e disponibilização do Museu da Patologia online (museudapatologia.ioc.fiocruz.br). Buscando complementar nossas atividades e fortalecer a atuação do Museu na divulgação científica e considerando que as exposições constituem um elemento fundamental de relação com a sociedade, produzimos uma exposição temporária do acervo do Museu da Patologia denominada “Corpo, Saúde e Ciência: Museu da Patologia do IOC”. Nesta exposição, são realizadas atividades didáticas que foram desenvolvidas pela equipe e que pertencem à expressão da vertente de ensino juntamente com um curso de formação continuada de professores. Os dados históricos e científicos gerados na pesquisa no acervo documental estão sendo compilados no banco de dados da CFA e serão disponibilizados no site Museu da Patologia Online juntamente com as imagens de lâminas escaneadas dos casos. Desta forma, esperamos fomentar a pesquisa neste tipo de acervo e salvaguardar este patrimônio para gerações futuras que, com certeza, terão outras ferramentas/tecnologias e outras perguntas científicas que poderão ser respondidas.

Em conjunto, as pesquisas realizadas na CFA, além de gerar conhecimento histórico e científico, poderão promover a capacitação de alunos de iniciação científica e de pós-graduação para a execução de trabalhos com cunho multidisciplinar integrando as ciências médicas, biológicas e humanas.

Palavras-chave: Coleção de Febre Amarela, biologia molecular, extração de material FFPE, análise documental, museu virtual, divulgação científica.

Apoio financeiro: FAPERJ, CNPq, BNDDES, DWIH e Fiocruz.

Resposta imune de *Rhodnius prolixus* frente à infecção por *Trypanosoma cruzi*: função de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na interação parasita, vetor e microbiota

Daniele Pereira de Castro - Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos/IOC/Fiocruz

Rhodnius prolixus Stal, 1959 é um inseto de grande importância epidemiológica por ser um dos principais vetores de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909, agente causador da doença de Chagas em regiões endêmicas. A transmissão do parasita para hospedeiros vertebrados depende de diversos fatores, que podem influenciar no sucesso da infecção do parasita no trato digestivo dos insetos, incluindo enzimas digestivas, hemolisinas, aglutininas, microbiota e respostas imunológicas (Garcia et al., 2010). Em relação ao sistema imune dos insetos, existem respostas do tipo ativação do sistema profenoloxidase, indução de fatores antimicrobianos, formação de reativos de oxigênio e nitrogênio, formação de microagregados, fagocitose e encapsulação pelos hemócitos que podem atuar sobre os parasitas impedindo seu desenvolvimento no inseto. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio possuem ação sobre microrganismos atuando sobre a superfície da membrana reagindo com lipídeos, proteínas e também DNA das células. Também podem atuar como moléculas sinalizadoras de outras respostas imunológicas fazendo a intercomunicação entre órgãos e tecidos do inseto. Em *R. prolixus* a produção de óxido nítrico na hemolinfa e trato digestivo é modulada por infecções pelo *T. rangeli* e *T. cruzi* (Whitten et al., 2001 e 2007). Esses autores demonstraram que os insetos infectados pro *T. cruzi* apresentaram alta concentração de óxido nítrico no intestino médio anterior após 1 a 2 dias de alimentação e que depois de duas semanas a concentração desse reativo diminui.

As principais respostas imunes descritas no trato digestivo são: produção de peptídeos antimicrobianos, produção de reativos de oxigênio e nitrogênio e profenoloxidase. Recentemente, observamos que insetos infectados com *T. cruzi* além de apresentarem menor microbiota, as respostas de produção de peptídeos antimicrobianos e profenoloxidase estão mais ativadas do que nos insetos controle e que a produção de reativos de nitrogênio é menor após 9 dias de infecção (Castro et al., 2012a). A investigação das principais respostas imunológicas que estão associadas com o sucesso da infecção do *Trypanosoma cruzi* é de extrema importância para identificar possíveis alvos para controle e inibição do desenvolvimento do parasita no vetor. Além disso, é necessário investigar a relação da microbiota com a resposta imunológica do inseto vetor e sua relação no estabelecimento da infecção do parasita. Assim, pretendemos com esse projeto quantificar a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio em diferentes órgãos de *R. prolixus* tratados com drogas indutoras e ou inibidoras dessa resposta imune e infectados ou não pelo *T. cruzi*. *E também analisar a interferência da ativação ou inibição de produção de reativos de*

nitrogênio e oxigênio em outras respostas imunológicas de insetos e em órgãos e tecidos não tratados. Como resultados preliminares observamos que a produção de derivados de óxido nítrico (nitrito e nitrato) é alterada quando os insetos são tratados com as drogas arginina e L-name (drogas indutoras e redutoras da produção de espécies reativas de nitrogênio, respectivamente) no trato digestivo e hemolinfa após 7 dias do tratamento. Os insetos tratados com arginina na concentração final de 2mg/mL de sangue apresentam maior quantidade de nitrito e nitrato no intestino médio anterior 7 dias pós tratamento. A parasitemia do *T. cruzi* também é afetada pela administração das drogas arginina e L-name. A arginina, droga que ativa a produção de reativos, parece diminuir a quantidade de parasitas encontrados no trato digestivo. O tratamento dos insetos com as drogas também causa alterações na atividade antibacteriana tanto no intestino médio anterior como na hemolinfa, o que indica sua ação sinalizadora de resposta imune. Assim, temos indícios da importância da produção de espécies reativas de nitrogênio para o sucesso da infecção do *T. cruzi*. Porém ainda são necessários diversos estudos tanto para analisar melhor o efeito dos reativos de nitrogênio como os reativos de oxigênio e seu efeito tanto no parasita como na microbiota do inseto. E ainda pretendemos analisar se essas moléculas participam da sinalização de resposta imune em demais órgãos e tecidos dos insetos.

Palavras-chave: *Rhodnius prolixus*, *Trypanosoma cruzi*, microbiota, imunidade, espécies reativas de nitrogênio e espécies reativas de oxigênio.

Taxonomia e Biologia dos Triatomíneos (Insecta: Hemiptera: Reduviidae) do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Felipe Ferraz Figueiredo Moreira - Laboratório Nacional e Internacional de Referência
em Taxonomia de Triatomíneos/IOC/Fiocruz

A doença de Chagas (DC) ou Tripanosomíase Americana é uma infecção que tem como agente etiológico o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). A DC é considerada uma das principais endemias da América Latina, devido ao seu elevado impacto social e econômico. Atualmente, afeta mais de 1,9 milhões de pessoas no Brasil. A principal forma de transmissão do protozoário ao homem e outros mamíferos envolve contaminação da pele e mucosas pelas fezes dos insetos hematófagos contaminados da subfamília Triatominae. Pode haver ainda transmissão pela ingestão de alimentos contaminados, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, congênita e em acidentes de laboratório. Triatomíneos são popularmente conhecidos no Brasil como barbeiros, e podem encontrados em ambientes silvestres (occos e cascas de árvores, buracos, fendas de rochas, grutas, cavernas e abrigos de animais), peridomiciliares (ao redor da casa; abrigos de animais domésticos, como galinheiros, chiqueiros, currais e canis) e também dentro dos domicílios (geralmente atraídos por fontes luminosas; frestas das paredes ou atrás de objetos como quadros, estantes e embaixo das camas). Eles são obrigatoriamente hematófagos, podendo se alimentar do sangue de mamíferos, aves, répteis e anfíbios, e ocasionalmente sugam a hemolinfa de outros artrópodes. A DC ainda não possui vacina ou cura definitiva, e com a expansão das populações humanas em áreas de endemismo, o controle dos vetores é a principal forma de diminuir os impactos provocados pelo agravo. Para tanto, a correta identificação taxonômica e estudos sobre biologia, distribuição geográfica e importância vetorial específica, além da educação da população, são fundamentais. A subfamília Triatominae divide-se em cinco tribos, 18 gêneros e 146 espécies. A maioria destas ocorre apenas na região neotropical e algumas poucas podem ser encontradas nos Estados Unidos, centro-sul da África, sudeste da Ásia e norte da Austrália. No Brasil, foram registradas corretamente até o momento 65 espécies, destacando-se *Triatoma infestans* (Berg, 1879), *T. brasiliensis* Neiva, 1911, *T. pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964, *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) e *Rhodnius robustus* Larrouse, 1927 como epidemiologicamente mais importantes devido às características comportamentais. A fauna conhecida do Estado do Rio Grande do Sul abrange até o momento doze espécies, sendo duas representantes do gênero *Panstrongylus* Berg, 1879 e dez de *Triatoma* Laporte, 1832.

Deste último, conhecem-se da região espécies dos subcomplexos *infestans* e *rubrovaria*, além de *T. sordida* (Stål, 1859). Através da colaboração da equipe do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos (LNIRTT) com as secretarias de saúde estadual e municipais do Rio Grande do Sul, diversas coletas vem sendo realizadas em áreas com relatos positivos de triatomíneos. Estas resultam na obtenção de grandes quantidades de espécimes vivos, que são incluídos em colônias do insetário do LNIRTT para estudos de biologia, e preservados, os quais são incorporados à coleção do referido laboratório e usados em estudos taxonômicos. Através de estudos taxonômicos clássicos, acompanhados de técnicas modernas de biologia molecular e morfometria geométrica, é possível reconhecer a existência espécies novas ocorrentes na região, caso da recém-descrita *T. pintodiasi* Jurberg, Cunha & Rocha, 2013. Além disso, o esclarecimento de aspectos da biologia de espécies de barbeiros é de grande importância para a avaliação da eficiência destes como vetores do *T. cruzi*. Uma vez que os triatomíneos são ectoparasitas temporários, ocorre um íntimo contato com seus hospedeiros durante a alimentação, e o tempo decorrido entre o repasto sanguíneo e a defecação apresenta grande impacto na epidemiologia da DC, pois quanto menor este maior a capacidade vetorial de determinada espécie. O ciclo de vida dos triatomíneos varia de acordo com a espécie e condições ambientais onde vivem, e é fortemente influenciado pela disponibilidade de fontes sanguíneas adequadas. Outros aspectos da sua biologia também são muito específicos, e a generalização de resultados pode levar a conclusões equivocadas. O conhecimento da duração provável do ciclo biológico, da fecundidade, da fertilidade e dinâmica populacional de uma espécie, obtível através dos experimentos realizados no insetário, permite estimar sua capacidade de colonização. Este conhecimento é particularmente importante quando se trata de espécies antropofílicas ou com tendências a domiciliação. Do mesmo modo, o conhecimento da capacidade de resistência ao jejum pode auxiliar no planejamento de programas de controle por meio de inseticidas de ação residual e estudo do substrato onde o mesmo é aplicado. Existe, portanto, urgência na realização de estudos envolvendo aspectos da biologia e taxonomia de triatomíneos, os quais ainda são desconhecidos para algumas das espécies encontradas no Estado do Rio Grande do Sul. Tais dados são fundamentais, pois permitem ampliar o conhecimento sobre a diversidade e distribuição do grupo e melhorar as estratégias de vigilância e controle vetorial na região.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Entomologia Médica, Vetores.

Avaliação do perfil de resposta imune em indivíduos infectados pelo HIV-1 com diferentes níveis de controle da replicação viral

Fernanda Heloise Côrtes - Laboratório de Aids e Imunologia
Molecular/IOC/Fiocruz

Introdução: Um raro grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 é capaz de manter a carga viral plasmática em níveis indetectáveis por testes clínicos, na ausência de terapia antirretroviral. Este grupo é comumente denominado controladores de elite (EC). Os mecanismos pelos quais este controle é mantido ainda não estão claros, e apesar de um estudo inicial colocar este grupo como uma população homogênea, atualmente é claro que se trata de uma população heterogênea. A resposta específica de células T CD8⁺ tem sido apontada como uma característica dominante na manutenção deste controle, no entanto, este importante papel ainda não é um consenso entre diferentes estudos, enquanto uns apontam uma resposta eficiente, com perfil polifuncional destas células e alta capacidade de inibição da replicação viral, outros encontram células com baixa resposta frente ao HIV-1. Além disto, apesar da forte associação entre alelos HLA-B27 e B57 com a não progressão para Aids, alguns indivíduos portadores deste alelo não são capazes de controlar a replicação viral, e nem todos EC possuem alelos classicamente associados a proteção contra a doença. Desta forma, tem se tornado cada vez mais claro que diversos fatores provavelmente contribuem para os diferentes níveis de controle da replicação viral em indivíduos infectados pelo HIV-1, incluindo a heterogeneidade genética do hospedeiro e fatores imunológicos e virológicos.

Justificativa: Baseado nisto, estudos que avaliem o perfil de resposta imune em coortes de controladores com diferentes *backgrounds* genéticos, associados à caracterização virológica, são de grande relevância para melhor entendimento do que é uma resposta protetora na infecção pelo HIV-1, auxiliando na busca de estratégias para indução de uma “cura funcional” ou mesmo novos desenhos vacinais.

Casuística e métodos: Até o momento 31 indivíduos infectados pelo HIV-1, com algum nível de controle da replicação viral e 11 indivíduos não controladores (NC) foram incluídos no estudo, todos assinaram o TCLE e o projeto foi aprovado pelo CEP IPEC. Destes, 27 controladores já possuem três anos de acompanhamento da carga viral, possibilitando a classificação nos seguintes grupos: (EC) controladores de elite, n=10, com todas as determinações de carga viral <80 cópias/mL; (EEC) controladores de elite com *blips*, n=5, com episódios transientes de viremia detectável em até 30% das avaliações; (VC) controladores virêmicos, n=12, com carga viral <5000 cópias/mL e detectável em mais de 30% dos pontos avaliados.

Para um grupo de 30 indivíduos (7 EC, 5 EEC, 7 VC e 11NC) já foram realizadas os seguintes análises: cálculo da curva de células T CD4⁺, avaliação da ativação de células T CD8⁺ (CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺), avaliação da resposta de células T Gag e Nef

específica pelo método de ELISpot IFN- γ e avaliação da translocação microbiana pela quantificação de sCD14. Além disto, foram feitas análises virológicas (DNA total, integrado e 2-LTR) e genéticas (tipagem de HLA-B e CCR5), por outros integrantes do grupo de pesquisa.

Resultados: Entre os indivíduos avaliados, a mediana do tempo de controle da replicação viral foi de 10 anos (IQR= 7-11), esta coorte foi enriquecida com alelos HLA-B*27 e B*57, mas nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos. Enquanto EC e EEC mantêm uma contagem estável de células T CD4⁺ ao longo do tempo, alguns VC apresentaram uma curva negativa, apontando para uma perda progressiva desta população, além de uma relação CD4⁺/CD8⁺ abaixo de 1. Os EC apresentaram nível de ativação de células T CD8⁺ similares a indivíduos não infectados pelo HIV-1, ao contrário do que foi observado para os EEC ($P= 0.0027$) e VC ($P= 0.0020$). Os EC também apresentaram menor resposta de células T frente a estímulos com peptídeos referentes a regiões imunogênicas das proteínas Gag e Nef do HIV-1, quando comparados aos outros dois grupos de controladores. Além disto, EC apresentaram menor nível de sCD14 do que os EEC, no entanto, comparável aos VC.

Conclusões preliminares: Os nossos dados apontam para um impacto na resposta imune, níveis de ativação celular e translocação microbiana em indivíduos que apresentam episódios intermitentes de viremia detectável, apontando para a necessidade de melhor divisão dos grupos de controladores na busca de características ligadas a uma resposta protetora.

Palavras-chave: HIV-1, controladores de elite, células T CD8⁺, ativação celular, translocação microbiana.

Estudo imunopatológico do baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*: Qual o mecanismo responsável pela falha no controle da carga parasitária?

Fernanda N. Morgado¹; Amanda Cavalcanti¹; Luisa H.M. de Miranda²; Rodrigo C. Menezes²; Áurea V.A. da Silva¹; Gustavo L. Mestre³; Elisa Cupolillo¹; Renato Porrozzini¹.

¹Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose (LPL) – IOC/Fiocruz

²Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LAPCLIN-DERMZOO) – IPEC/Fiocruz

³Centro de Controle de Zoonoses de Cuiabá e Secretaria de Saúde do Estado de Mato Grosso

No Brasil, a leishmaniose visceral é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e se encontra em expansão em várias regiões. O cão doméstico é considerado o principal reservatório urbano e a eutanásia de cães soropositivos tem sido utilizada como uma das estratégias de controle da doença. Vacinas caninas já estão sendo comercializadas, mas permanecem em fase de avaliação de eficácia. Além disso, o cão é considerado um modelo para o entendimento da doença humana, já que os cães doentes apresentam características muito semelhantes aos indivíduos susceptíveis. Neste contexto, entender alguns aspectos da imunopatogenia da leishmaniose visceral canina (LVC) poderia trazer informações relevantes ao controle da doença, ou mesmo ao tratamento de pacientes humanos. Os dados da literatura relacionados a resposta imune na LVC ainda são controversos. De uma forma geral, tem sido demonstrado que animais resistentes apresentam resposta linfoproliferativa *in vitro*, teste intradérmico positivo, baixa carga parasitária, baixo título de anticorpos anti-*Leishmania*, aumento da expressão de IFN- γ e redução de IL-10. Por outro lado, animais doentes apresentariam alta carga parasitária, forte resposta humoral com alto título de anticorpos específicos, redução na expressão de IFN- γ e aumento de IL-10 em sangue periférico (Maia & Campino 2012, J Trop Med 2012:541571). O baço está entre um dos principais órgãos afetados na LVC e responsável, em grande parte, pela resposta imune à infecção, porém o conhecimento dos mecanismos imunopatológicos envolvidos é limitado, sendo a maioria dos estudos focados no modelo murino de infecção experimental. O baço é um importante órgão linfóide secundário de grande volume com função primordial de responder aos patógenos sistêmicos (Mebius & Kraal 2005, Nat Ver Immunol 5(8):606-16). É um tecido linfóide altamente organizado e a desorganização da arquitetura do baço de cães com leishmaniose visceral tem sido associada à progressão da doença e à redução da expressão de diversas quimiocinas e seus receptores (Santana et al. 2008, Parasite Immunol 30(10):515-24; Silva et al. 2012,

PloS One 7(1):e29103; Nascimento et al. 2013, Vet Immunol Immunopathol 153(3-4):202-8). Porém a maioria dos dados publicados até o momento utilizam a expressão de RNAm por RT-qPCR como ferramenta, o que apresenta limitações de análise, principalmente na associação dos achados experimentais com a arquitetura tecidual.

Além disso, observa-se falta de informações relacionadas ao processo de ativação dos linfócitos T e B nos diferentes compartimentos do baço, já que a compartimentalização do tecido linfóide esplênico é altamente regulada, assim como os locais de ativação dos linfócitos T e B. Parasitemia intensa tem sido observada nos estágios tardios da infecção canina, assim como a perda de resposta linfoproliferativa que poderia estar relacionada a falhas na cooperação celular. Já foi demonstrada a expressão de citocinas inflamatórias durante a leishmaniose visceral canina (Strauss-Ayali et al. 2007, Vet Res 38(4):547-64; Boggiatto et al. 2010, Clin Vaccine Immunol 17(2):267-73), assim como de metaloproteinases no soro de animais infectados, como por exemplo a MMP-9 (Melo et al. 2009, Int J Exp Pathol 90(5): 538-48).

Estes fatores poderiam estar relacionados à desestabilização tecidual, com consequente deposição de componentes de matriz extracelular e fibrose. Como resultado haveria a ruptura da compartimentalização da polpa branca que poderia provocar falhas na cooperação e ativação celular que levaria à ausência/deficiência de resposta celular específica e perda do controle da carga parasitária. Por outro lado, a possibilidade de exaustão imune induzida pelo parasita deve ser considerada como hipótese alternativa (Barber et al. 2006, Nature 439:682-7; Murphy et al. 1998, J Immunol 161:4153-4160). Assim, o presente projeto tem como finalidade avaliar a correlação entre a organização da polpa branca, fibrose do tecido, carga parasitária, marcadores de perfil celular (linfócitos CD4⁺, CD8⁺, B/CD20⁺, macrófagos/CD68⁺, monócitos/CD14⁺ células dendríticas/CD11c⁺ e células dendríticas foliculares), cooperação/ativação (CD45RA, CD40, CD44, MHC-II, PD-1, CTLA-4), funcional (IL-21, IL-27, IL-27R α , IFN- γ , IL-10, TNF- α , NOS2), migração celular (CXCL13, CCL21, CCR7) e interação com a matriz extracelular (MMP-9, ADAM-10, LFA-1, CD44) através de análise histopatológica, colorações especiais para matrix extracelular, imunohistoquímica e imunofluorescência. Para tal, serão utilizados cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Cuiabá e da Secretaria de Saúde do Estado de Mato Grosso, submetidos à eutanásia pelo próprio CCZ, devido ao diagnóstico de leishmaniose visceral, como indicado pelos órgãos de vigilância e controle das leishmanioses. Serão formados 3 grupos de estudo (mínimo 10 animais por grupo) de acordo com o grau de organização da polpa branca do baço: 1- organizados ou pouco desorganizados (PD); 2- média desorganização (MD); 3- intensa desorganização (ID). Os dados clínicos dos animais já foram coletados, assim como os fragmentos de baço, estes últimos conservados em formol e incluídos em parafina/congelados em Tissue Teck^R. Foram preparadas lâminas com cortes teciduais corados pela hematoxilina e eosina. As análises histopatológicas já foram iniciadas. Até o momento, foram analisadas 59 amostras nas quais foi possível observar os 3 diferentes tipos de organização da polpa branca (PD=21; MD=27; ID=11). Foi feita a quantificação da carga parasitária por qPCR e a caracterização em alta ou baixa carga parasitária (baixa=33 e

alta=26). Observou-se associação entre a desorganização da polpa branca e a carga parasitária ($p=0,015$; odds ratio = 4,463).

Aproximadamente 51% dos animais com baixa carga parasitária já apresentavam média ou intensa desorganização, enquanto no grupo de animais com alta carga parasitária o mesmo era observado em 81% dos casos. É possível que no início da infecção, o parasita induza intensa resposta inflamatória, com produção de citocinas inflamatórias e enzimas que levem a desestabilização da arquitetura do baço e ao processo de fibrose. A partir daí, ocorreriam falhas nos processos de ativação e migração das células imunológicas, que resultariam na ruptura dos folículos linfóides da polpa branca, com consequente perda do controle da carga parasitária e evolução para o quadro clínico da leishmaniose visceral canina. A possibilidade de exaustão imune induzida pelo parasita não pode ser descartada, e portanto, como perspectiva futura consideramos a possibilidade de coleta de novas amostras de baço para a separação das células esplênicas, cultivo na presença de antígenos de *Leishmania* sp e análise de proliferação e ativação celular, para verificar a possibilidade do fenômeno de exaustão imunológica.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina, baço, imunopatologia, *Leishmania infantum*, imuno-histoquímica.

Aspectos genéticos no câncer hereditário, tumores sólidos pediátricos, malformações congênitas, doenças neurodegenerativas e do neurodesenvolvimento

Fernando Regla Vargas - Laboratório de Epidemiologia de Malformações Congênitas/IOC/Fiocruz

Formação: Graduação em medicina (1985), residência médica em pediatria (1988), título de especialista em genética médica (1993), mestrado em genética (1994), doutorado em genética (1999). Áreas de atuação e interesse: genética médica, malformações congênitas, câncer hereditário, tumores sólidos pediátricos, neurogenética, síndrome de Rett. **Projetos:** (1) Caracterização de alterações no gene *RB1* e na região 13q14 em portadores de retinoblastoma, e polimorfismos e amplificação nos oncogenes *MDM2*, *MDM4*, *NMYC* em portadores de retinoblastoma. Este projeto conta com uma aluna de aperfeiçoamento, uma aluna de doutorado e uma aluna de pós-doutorado. (2) Polimorfismos em genes de controle do ciclo celular e em genes de microRNAs no desenvolvimento e evolução do retinoblastoma. Este projeto conta com uma aluna de doutorado e uma aluna de pós-doutorado. (3) Investigação de alterações genéticas e epigenéticas em 11p13 e *WTX* em portadores de tumor de Wilms (nefroblastoma).

Este projeto conta com uma aluna de pós-doutorado e um aluno de iniciação científica. (4) Alterações germinativas no gene *TP53* em portadores de síndrome de Li-Fraumeni e em portadores de tumores sólidos pediátricos. Este projeto conta com uma aluna de doutorado. (5) Investigação de anomalias congênitas menores e síndromes dismórficas, e prevalência e caracterização da síndrome de deficiência constitucional de genes MMR em portadores de tumores sólidos pediátricos. Este projeto conta com uma aluna de doutorado e dois alunos de iniciação científica. (6) Investigação de mutações fundadoras nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* em portadoras de câncer de mama, endométrio, e/ou ovário. Este projeto conta com um aluno de mestrado. (7) Investigação da prevalência de fatores genéticos e hereditários em uma amostra consecutiva de câncer colo-retal. Este projeto conta com uma aluna de doutorado. (8) Análise do gene *MECP2* em portadoras de síndrome de Rett. Este projeto conta com uma aluna de iniciação científica. (9) Estudo etiológico das ataxias espinocerebelares e da doença de Huntington. Este projeto ocorre através de uma colaboração entre o Hospital Universitário Gaffrée-Guinle (Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO) e o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS). **Orientações:** Duas alunas de pós-doutorado. Quatro alunas de doutorado. Um aluno de mestrado. Dois médicos residentes em genética médica, um R1 e uma R3. Duas alunas de iniciação científica. Dois alunos de extensão. Estas orientações acontecem em três programas de pós-graduação: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) da

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, e Programa de Pós-Graduação em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer. **Auxílios:** (1) Faperj edital hospitais universitários 2012-2014; (2) CNPq edital universal 2012-2014. **Metas:** (1) implantar análise molecular do gene *RB1* em portadores de retinoblastoma, associado a um programa de aconselhamento genético; (2) implantar pesquisa de mutações no gene *MECP2* e outros genes relacionados em portadoras de síndrome de Rett; (3) orientar ao nível de iniciação científica, especialização, aperfeiçoamento e pós-graduação na instituição; (4) trazer para a instituição os projetos de pesquisa em andamento; (5) supervisionar e fomentar a análise e discussão de casos clínicos junto às maternidades da rede ECLAMC (Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênitas); (6) implantar análise molecular do gene *TP53* em portadores de síndrome de Li-Fraumeni, e em portadores de tumores sólidos pediátricos; (7) fomentar projetos nas áreas de dismorfologia, malformações congênitas, câncer hereditário, genética dos tumores sólidos pediátricos.

Palavras-chave: câncer hereditário, tumores sólidos pediátricos, malformações congênitas, dismorfologia, retinoblastoma, tumor de Wilms, síndrome de Rett, *RB1*, *TP53*, *MECP2*, neurogenética.

Investigação de fatores genéticos, ambientais e neuromodulatórios na etiologia de distúrbios neuropsiquiátricos

Frederico Rogério Ferreira - Laboratório de Pesquisa sobre o Timo/IOC/Fiocruz

A grande maioria dos transtornos neuropsiquiátricos como a ansiedade crônica (AC), depressão principal (MD), transtorno compulsivo obsessivo (TOC), estresse pós-traumático (PTST), esquizofrenia (SZ), autismo (AU), transtorno bipolar (TB), psicose, doença de Alzheimer, doença de Parkinson entre outros, apresentam etiologia complexa.

Por volta da década de 70 estudos de prevalência de doenças neuropsiquiátricas entre gêmeos idênticos produziram fortes evidências do substrato genético nestas afecções. Desde então tem ganhando corpo os grupos interessados na investigação da associação entre polimorfismos de DNA, expressão gênica, genômica ou proteômica com fatores ambientais e endógenos que possam interferir na suscetibilidade às doenças neuropsiquiátricas ou na resposta terapêutica a psicotrópicos. A hipótese da interação genética e ambiente recebeu substancial reforço após uma série de trabalhos que demonstraram a associação entre o polimorfismo no promotor para proteína transportadora de serotonina (5-HTTLPR) e a suscetibilidade para manifestação de sintomas psiquiátricos como ansiedade e depressão, uma vez que essa associação parece estar presente somente entre indivíduos com prévio histórico de experiências estressantes. Assim, atualmente acredita-se que o substrato genético possa representar em torno de 40-60% das causas de transtornos psiquiátricos.

Contudo o polimorfismo em único gene parece não ser suficiente para explicar questões como a latência para o efeito do tratamento medicamentoso, a resistência ao tratamento, recaídas após interrupção do tratamento. Entre os principais fatores ambientais relacionados destacam-se as infecções e alterações imunológicas ocorridas durante a gestação ou nos estágios iniciais do desenvolvimento/amadurecimento do Sistema Nervoso Central. Neste sentido, a influência ambiental no surgimento da doença ou ainda na gravidade dos sintomas vem sendo investigada. Por exemplo, estudos epidemiológicos mostram um risco aumentado entre 5-15% de desenvolver esquizofrenia para indivíduos nascidos entre o final da primavera e início do inverno. O risco de desenvolver SZ também é proporcional ao nível de urbanização. Efeito semelhante foi descrito para o risco de desenvolver doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e Parkinson.

Diante destas evidências, e outras da literatura, o presente estudo objetiva investigar a hipótese de que a exposição a insultos como estresse, infecção, fármacos psicotrópicos durante as fases iniciais do desenvolvimento (pré-natal, ou perinatal) seria responsável por promover alterações no perfil de expressão gênica. Estas alterações estariam associadas aos prejuízos neurocognitivos/neuroestruturais importantes para a etiologia dos transtornos neuropsiquiátricos e/ou neurodegenerativos.

Palavras-chave: neurobiologia, transtornos psiquiátricos, neurodesenvolvimento.

Origem e dinâmica de disseminação do HIV-1 subtipo C no Brasil

Gonzalo José Bello Betencor – Laboratório de Aids e Imunologia Molecular/IOC/Fiocruz

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma das doenças infecciosas emergentes de maior importância a afetar a espécie humana. No Brasil, estima-se que aproximadamente 600 mil pessoas estejam infectadas com o agente causador da doença, o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). O HIV-1 exibe um extraordinário grau de variabilidade genética o que supõe um enorme desafio para o desenvolvimento de vacinas capazes de controlar esta pandemia. O HIV-1 subtipo C foi responsável por aproximadamente metade de todas as infecções pelo HIV no mundo no período 2004-2007. Este subtipo de HIV-1 é predominantemente encontrado no sul e leste da África, na Índia e no Brasil. Enquanto na maior parte do Brasil a epidemia de AIDS tem sido dominada pelos subtipos B, F1 e recombinantes BF1, a região Sul do Brasil tem se caracterizado por uma elevada prevalência do subtipo C (20-30% no estado de Paraná, 30-40% no Rio Grande do Sul, e 50-80% em Santa Catarina). Os estados de Rio Grande do Sul e Santa Catarina também apresentam atualmente os municípios com as maiores taxas de incidência de AIDS no Brasil. Estudos recentes apontam para um crescente número de infecções pelo subtipo C em várias cidades de estados do Sudeste e Centro-Oeste, sugerindo a disseminação recente do subtipo C além da região Sul. A alta prevalência do HIV-1 subtipo C em países e regiões com elevada taxa de incidência de AIDS, apontam para um elevado potencial de expansão epidêmica deste subtipo viral e evidenciam a importância de um monitoramento estruturado das vias de disseminação do HIV-1 subtipo C no Brasil.

No entanto, estudos filogeográficos e epidemiológicos do HIV-1 subtipo C que circula fora da região Sul ainda são escassos. O objetivo deste projeto é caracterizar geneticamente o HIV-1 subtipo C que circula nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, no sentido de identificar sua origem e compreender a dinâmica de disseminação deste subtipo no Brasil. Reconstruir a origem e as rotas de disseminação do HIV-1 subtipo C nas diferentes regiões do Brasil contribuirá para um melhor entendimento do potencial de expansão epidêmica e dos principais fatores que modulam a disseminação desta variante de HIV, assim como para o direcionamento de políticas públicas que visem diminuir a taxa de transmissão do vírus.

Palavras-chave: HIV-1, subtipo C, Brasil, evolução, filodinâmica.

Potencial antigênico e imunogênico de antígenos lineares sintéticas contendo epitopos de células B e T das proteínas de superfície de merozoítos (PvMSP-1, PvMSP-9 e PvAMA-1) e esporozoítos (PvCSP) de *Plasmodium vivax*

Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva ^{a, b}, Amanda Ribeiro Ferreira ^a, Alberto Moreno^c, Dalma Maria Banic^d, Paula Melo de Luca^a, João Hermínio Martins^e, Joseli de Oliveira Ferreira^a, Josué da Costa Lima-Junior^a

a Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz- RJ;

b Departamento de processamento final, Biomanguinhos, Fiocruz-RJ

c Emory Vaccine Research Center, Emory University, Atlanta – USA

d Laboratório de Simulídeos e Oncocercose, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz-RJ

e Laboratório de Modelagem Molecular, Fiocruz-CE

Introdução: O mapeamento de regiões antigênicas por predição *In silico* e a confirmação imuno-molecular de epítomos de células B e T tem fornecido importantes subsídios para o desenvolvimento de novos candidatos vacinais e testes de diagnósticos eficazes. Na malária, estudos que utilizem ferramentas de bioinformática aliados a confirmação experimental com antígenos de *Plasmodium* ainda são escassos, e quando restritos ao *P. vivax* tornam-se quase inexistentes.

Atualmente, existem menos de uma dezena de antígenos de *P. vivax* considerados candidatos vacinais e nenhum deles foi capaz de induzir imunidade protetora quando utilizado individualmente. A nossa hipótese é que a construção de um antígeno de *P. vivax* constituído por múltiplos determinantes antigênicos e com comprovada capacidade de estimular diferentes tipos celulares possa potencializar a produção de anticorpos capazes de inibir a invasão e desenvolvimento do parasita na hemácia. Portanto, os **objetivos e métodos** deste projeto são: 1) detectar *In silico* os possíveis epitopos de células B e T (programas Bepipred e Immune Epitope Database respectivamente) presentes nas proteínas candidatas vacinais PvMSP9, PvMSP1, PvAMA e PvCSP; 2) Confirmar imunologicamente a importância destes determinantes antigênicos tanto na resposta imune naturalmente adquirida em humanos (ELISA) como na induzida em camundogos (ELISA, FLUOROSPOT e Citometria de Fluxo); 3) Construir e avaliar a imunogenicidade de peptídeos lineares quiméricos, sintetizados a partir da fusão das sequências imunodominantes dos diferentes candidatos vacinais; 4) Determinar a capacidade de reconhecimento (Imunofluorescência indireta) e inibição de crescimento parasitário dos anticorpos gerados contra os antígenos quiméricos sintéticos.

Resultados preliminares: Após a aplicação dos algoritmos e coeficientes de predição, aliados aos trabalhos anteriormente publicados pelo nosso grupo, os epítomos de maior “score” foram classificados para cada antígeno candidato a vacina. Inicialmente, as regiões PvMSP-9⁴⁰³⁻⁴²⁴ e PvAMA-1²⁹⁰⁻³⁰⁷ apresentaram epítomos lineares de células B com mais alto potencial de reconhecimento por anticorpos naturalmente adquiridos. Além disso, 3 sequências peptídicas de epítomos de células T-CD4 presentes na PvMSP-9 (pL) e PvMSP-1 (p1 e p2) apresentaram características de promiscuidade em relação a HLA de classe II, enquanto a PvCSP apresentou um forte epítomo de células T-CD8 com propriedades antigênicas e de promiscuidade em relação ao HLA de Classe I. **Perspectivas:** Após a síntese de peptídeos quiméricos baseados nos dados anteriores realizaremos as imunizações de camundongos BALB/c para verificação das propriedades antigênicas e imunogênicas destes novos antígenos sintéticos contendo múltiplos epítomos (topologia Cys-T-B-CTL-Cys e Cys T-T-B-Cys), bem como a avaliação as subpopulações celulares (células T e B de memória central e efetora) envolvidas no processo de aquisição de imunidade. Nesse contexto, pretendemos contribuir para a construção de um antígeno sintético, multi-antigênico, baseado em fragmentos conservados que apresentem em epítomos de células B, T-CD4 e T-CD8 presentes em 4 das principais candidatas vacinais contra o P. vivax.

Palavras-chave: Malaria, P. vivax, Vacinas, Peptídeos sintéticos, Fluorospot

Recombinant Modular Chimeras of *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Protein-1 (PvRMC-RBP1): IgG antibodies profile in *P. vivax* exposed population from Amazon region

Amanda Ribeiro Ferreira¹; Alana Magri de Souza¹; Alberto Moreno²; Mary Galinski²; Fatima Santos³; Dalma Maria Banic⁴; Joseli Oliveira Ferreira¹; Josué da Costa Lima-Junior¹

1 Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz- RJ; 2 Emory Vaccine Research Center, Emory University, Atlanta – USA; 3 Laboratório Central, Fundação Nacional de Saúde, Porto Velho-RO; 4 Laboratório de Simulídeos e Oncocercose, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz-RJ

Introduction: The identification of functional sub domains and protective B-cell epitopes is a valuable strategy in the development subunit vaccines. Immunogenicity of subunits vaccines can be dramatically enhanced by introduction of T cell epitopes. The N-terminal region of the PvRBP-1 protein (PvRBP-1₄₃₁₋₇₄₈) is highly antigenic and it is recognized mainly by natives from malaria endemic areas of the amazon. **Objective:** In this context, we addressed our study to evaluate if the insertion of T-cell epitopes in a chimeric protein (PvRMC-RBP1₄₃₁₋₇₄₈) could interfere with the recognition of naturally induced antibodies against the B cell epitopes of PvRBP-1₄₃₁₋₇₄₈. **Methods:** The chimeric protein was expressed containing the PvRBP-1₄₃₁₋₇₄₈ fragment linked to three T-Cell epitopes at the C-terminal region (PvRMC-RBP1₄₃₁₋₇₄₈) and non-chimeric (PvRBP-1₄₃₁₋₇₄₈) were also expressed as control. Naturally exposed individuals (n=259) were screened by ELISA to detect antibodies (IgG and IgG subclass) against PvRMC-RBP1₄₃₁₋₇₄₈ and PvRBP-1₄₃₁₋₇₄₈. We also evaluate the antibodies response for both antigens by HLA-Class II allelic groups. **Results:** Firstly, we observed that PvRMC-RBP1₄₃₁₋₇₄₈ was recognized by 47.1% of individuals naturally exposed to *P. vivax* while 60% of the individuals recognized PvRBP-1₄₃₁₋₇₄₈ (60%). The IgG reactivity index (RI), which ranged from 0,21 to 7,30 was not different between both recombinant antigens and they were associated with years of residence in malaria endemic area (p<0,0001) and number of previous infections (p<0,005). The frequency of IgG subclasses showed a predominance of IgG1 for PvRMC-RBP1₄₃₁₋₇₄₈, (73.3%) and PvRBP1₄₃₁₋₇₄₈ (42,5%), while IgG2, IgG3 and IgG4 reactivity was not predominant. Moreover, although 52,9% of the population did not present IgG antibodies to PvRMC-RBP1₄₃₁₋₇₄₈, we know that genetic restriction to this antigen does not seem to occur, since no association was observed between the HLA-DRB1* or HLA-DQB1* alleles and the naturally acquired IgG response against PvRBP-1₄₃₁₋₇₄₈.

Conclusion: Thus, our data shows that PvRMC-RBP1₄₃₁₋₇₄₈ is recognized by naturally induced antibodies, specifically by IgG1 and in plasma from individuals with cumulative malaria episodes in the past. However the higher response against PvRBP-1₄₃₁₋₇₄₈ may indicate that the structural conformation of PvRMC-RBP1₄₃₁₋₇₄₈ could affect the antigen recognition. Therefore, studies are in progress to confirm the role of T-cell epitopes in increasing response against PvRBP-1₄₃₁₋₇₄₈ region.

Keywords: *P. vivax*, Recombinant Modular Chimeras, Vaccine, ELISA, HLA

Análise comparativa dos perfis de reconhecimento de soros do Sul do Brasil reativos para hidatidose no Immunoblot

Leandro Batista das Neves - Laboratório de Helminthos Parasitos de Vertebrados/IOC/Fiocruz

A Hidatidose cística causada por *Echinococcus granulosus* é uma doença endêmica no estado do Rio Grande do Sul (RS). A infecção em ungulados provoca perdas econômicas por meio da condenação dos fígados infectados. No homem as larvas também acometem geralmente o fígado onde formam cistos comprometendo as funções do órgão. O diagnóstico consiste na identificação de cistos por técnicas de imagem e pela detecção de anticorpos por testes imunológicos. O objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento do perfil de reconhecimento no Immunoblot dos soros reativos para Hidatidose provenientes do Sul do Brasil recebidos pelo Serviço de Referência entre 2010 e julho de 2013. De todos os 160 soros recebidos, sendo 153 do RS e 7 de Santa Catarina (SC), 16 soros foram reativos, sendo todos do RS. Todos apresentaram anticorpos IgG que reconheceram pelo menos uma das quatro proteínas antigênicas utilizadas como referência no teste (43, 32, 18 e 7 kDa). Destas amostras, 9 tiveram um perfil composto pelo reconhecimento das quatro proteínas, 1 soro reconheceu três proteínas (43, 18 e 7 kDa) e 6 reconheceram apenas duas proteínas (5 com perfil das proteínas 43 e 32 kDa e 1 soro com as de 18 e 7 kDa). A análise comparativa dos perfis apresentados pelas amostras reativas demonstrou a heterogeneidade no reconhecimento das proteínas específicas atualmente utilizadas no Immunoblot, o que nos leva a necessidade de realizar estudos complementares.

Palavras-chave: *Echinococcus granulosus*; diagnóstico; Rio Grande do Sul; Brasil.

Construção de bibliotecas genômicas, para descrição do viroma do soro de pacientes com indicação clínica Dengue ou Febre Amarela, previamente testados com resultado negativo para estas

Marcos César Lima de Mendonça - Laboratório de Flavivírus/IOC/Fiocruz

As arboviroses (arthropod-borne viruses) são infecções causadas por vírus que se mantêm na natureza através de ciclos que envolvem artrópodes que se alimentam de sangue de vertebrados, principalmente mamíferos e aves. Entre as arboviroses de importância para saúde humana, podemos citar vírus das famílias: *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*- Mayaro (MAYV), as Encefalites Equinas (VEEV, EEEV, WEEV) e Chikungunya (CHIKV); *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*- vírus da Dengue (DENV), Febre amarela (VFA), Encefalite Japonesa (JE), Encefalite Saint Louis (SLEV) e West Nile (WNV); *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*- Oropouche (OROV) e sorogrupo Simbu. O Brasil com dimensões continentais e fisiogeografia composta por diferentes biomas apresenta condições ideais para a circulação de arbovírus, mais de 200 espécies de arbovírus já foram isolados no país sendo cerca de 40 patógenos humanos. A existência de áreas urbanas populosas e com elevados índices de infestação de artrópodes antropofílicos como *Aedes* e *Culex*, vetores de diferentes arboviroses como DENV, WNV, FA, SLEV, ROCV, ILHV, CHKV, aliado a possibilidade de indivíduos infectados oriundos de regiões onde outros arbovírus estão presentes, são importantes fatores que elevam o risco para a ocorrência e expansão de arboviroses no país.

No diagnóstico laboratorial de rotina nos serviços de saúde, são utilizadas metodologias específicas, para identificação de um determinado agente infeccioso, que geralmente são aqueles para os quais o médico que atendeu o paciente suspeitou. O que pode acontecer muitas vezes é que determinados sintomas, podem ter inúmeras possibilidades de agentes causais e geralmente o médico associa a clínica do paciente aos dados epidemiológicos do momento em que o paciente foi atendido, por exemplo, em grandes epidemias de Dengue, sintomas compatíveis com a doença, geralmente são indicados para pesquisa diagnóstica por esse agente. Os casos com diagnóstico laboratorial negativo, muitas vezes ficam sem a confirmação do seu agente causal. Diferentes vírus podem circular na população simultaneamente, durante surtos de outras doenças, passando despercebidos pelos serviços de saúde. Devido a grande quantidade de espécies virais conhecidas e até mesmo desconhecidas, que podem causar doenças no ser humano, ficaria inviável testar todas as possibilidades em todos os pacientes.

Para a identificação desses vírus é necessária a utilização de metodologias que consigam coletar dados do agente infeccioso através de uma abordagem que adquira informação de forma aleatória. A utilização de metodologias que purifiquem partículas virais, associadas a técnicas de PCR randomizadas, para identificação por sequenciamento, parece ser uma boa metodologia, para conseguir esclarecer esses casos. Atualmente diversos trabalhos científicos, utilizando esse tipo de abordagem vêm demonstrando a presença de agentes virais conhecidos, ou até mesmo identificando novas espécies virais, estudando amostras com diagnóstico laboratorial não resolvido.

Nesse projeto, padronizaremos em nosso laboratório, uma metodologia para a pesquisa de vírus com genoma DNA e RNA, em amostras de pacientes com suspeita clínica de Dengue, mas com diagnóstico laboratorial negativo. Para atingir esse objetivo, trabalharemos

As amostras em pools de soros de pacientes, as partículas virais serão purificadas, a partir dos pools de soros, por ultracentrifugação, ressuspendidas e tratadas com RNases e DNases para eliminar contaminantes de ácido nucleico não protegidos por envoltório viral. Realizaremos extração do ácido nucleico com QIAamp Viral RNA Mini Kit da QIAGEN. O ácido Nucleico extraído será dividido em duas alíquotas. A alíquota para pesquisa de vírus com genoma de RNA será tratada com DNase, enquanto a alíquota para pesquisa de vírus DNA não sofrerá tratamento. Para os vírus de genoma RNA, utilizaremos um protocolo para a produção cDNA de tamanho longo por transcrição reversa com iniciadores randômicos, seguida de reação de PCR utilizando iniciadores randômicos para a amplificação de produtos de PCR aleatórios, para os vírus de genoma RNA não utilizaremos a etapa de transcrição reversa. Os produtos de PCR serão clonados em plasmídeos que utilizam a tecnologia Topo TA e em seguida realizaremos o sequenciamento e busca por homologia, no banco de dados do GenBank utilizando o programa Blast. Os resultados obtidos nesse estudo nos permitirão descobrir que viroses podem estar sendo negligenciadas, se camuflando em meio a grandes surtos de Dengue, prestando assim um grande serviço para o sistema de Saúde Brasileiro e ampliação do conhecimento científico em relação a presença de patógenos que circulam na população.

Palavras-chave: Arboviroses, Biblioteca Genômica, Viroses negligenciadas

Mutações e variações no número de cópias gênicas como causas, fatores de risco ou moduladores das doenças neurodegenerativas

Mário Campos Junior - Laboratório de Genética Humana/IOC/Fiocruz

O envelhecimento populacional é um dos maiores desafios atuais da saúde pública e, em decorrência deste fato, a incidência de doenças neurodegenerativas tem aumentado significativamente nos últimos anos. Neste grupo de doenças encontra-se a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), uma doença motora que limita a sobrevivência dos pacientes em 2-5 anos após sua manifestação. A Esclerose Lateral Amiotrófica ou doença de Charcot é uma doença neurodegenerativa grave, rapidamente progressiva e fatal, caracterizada pelo comprometimento dos neurônios motores superiores, localizados no córtex motor, e dos neurônios motores inferiores, localizados no tronco cerebral e na medula espinhal. A perda destes neurônios leva à fraqueza progressiva e à perda da massa muscular, seguida de morte por insuficiência respiratória. Neurônios no córtex pré-frontal e temporal também podem ser afetados, mas em graus que variam de indivíduo para indivíduo. Quando estas áreas são afetadas há perda de funções do córtex e os pacientes exibem, além dos sintomas motores, sinais característicos da demência frontotemporal, como alterações no comportamento pessoal e social. Em geral, a ELA acomete indivíduos de meia idade (a partir dos 40 anos de idade). Formas juvenis de ELA, como é o caso do famoso físico briânico Stephen Hawking, são raras. Esta doença se apresenta de duas formas: com herança familiar (ELAF) e esporádica (ELAE). ELAF é a forma monogênica da doença, presente em aproximadamente 10% dos casos, nos quais mutações em vários genes já foram identificadas. Os indivíduos portadores de ELAF podem apresentar herança autossômica dominante ou recessiva, com afetados em uma ou várias gerações. Existem, até o momento, mais de 20 fatores genéticos associados a forma familiar desta doença. Entretanto, apenas uma pequena fração dos pacientes de ELA possui herança familiar. A forma esporádica é significativamente mais comum (~90% dos casos). No entanto, sua etiologia continua amplamente desconhecida, mesmo sabendo que existe um forte componente genético. Diversas tentativas de associação de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) com o risco de desenvolvimento de ELAE foram publicadas. Estudos de associação em todo o genoma (GWAS) observaram associação entre ELAE e SNPs em alguns genes que codificam proteínas envolvidas na função neurológica. Entretanto, as associações descritas em alguns trabalhos não foram necessariamente replicadas em trabalhos posteriores.

Com todos estes fatores genéticos já associados à ELA, pode-se observar a significativa complexidade molecular desta doença. Entretanto, com os avanços no estudo destas bases genéticas, começa a ser possível a construção de teorias relativas às vias bioquímicas comprometidas que levam à neurodegeneração.

A presença de mutações em genes correlacionados com a função proteossômica ou autofágica, por exemplo, sugerem a participação destas vias na base molecular da doença, entretanto, deve-se considerar a possível presença de funções alternativas sendo comprometidas nestas proteínas, que explicariam melhor o

fenótipo observado na doença e a sua especificidade celular. Ainda não se sabe se o sistema de degradação por proteossomo ou a maquinaria autofágica são o ponto chave no comprometimento da degradação proteica na ELA, ou se são apenas mais uma via afetada. Além disso, um número surpreendente de mutações em genes ligados diretamente ou indiretamente ao processamento de RNA foram encontradas em pacientes com ELA.

Além destes fatores, variações no número de cópias gênicas podem exercer uma influência essencial na manifestação da ELA. A variação do número de segmentos genômicos, como grandes duplicações ou deleções, tem sido reconhecida como uma importante fonte de variação genética entre indivíduos. Tais eventos genéticos causam principalmente a perda do controle da expressão gênica e são indetectáveis pela maior parte dos métodos de rastreamento de mutações de ponto utilizados na Biologia Molecular. Recentemente, este novo tipo de mutação reiterou a importância da influência genética no desenvolvimento da ELAE. A variação no número de cópias de grandes segmentos de DNA, causando a duplicação de genes específicos, *SMN1* e *IDI1*, foram associadas significativamente com a doença na população holandesa e japonesa, respectivamente.

Neste projeto, temos como objetivo rastrear estas duplicações em uma amostra de pacientes brasileiros com ELA, assim como em indivíduos saudáveis voluntários, estabelecendo o real papel destas variações no risco de desenvolvimento da doença e gerando os primeiros dados da epidemiologia genética da ELA no Brasil. As metodologias moleculares que serão estabelecidas e utilizadas neste estudo (qPCR, MLPA, sequenciamento de nova geração) serão utilizadas posteriormente no rastreamento de novos genes relacionados com doenças neurológicas. Este projeto visa reforçar a linha de pesquisa que estuda as causas genéticas das doenças neurodegenerativas, desenvolvida no Laboratório de Genética Humana – IOC e consolidar o rastreamento de alterações do número de cópias de grandes segmentos de DNA no genoma como ferramenta essencial para o diagnóstico molecular. Este estudo conta com auxílio financeiro da FAPERJ, através do edital APQ1, aprovado este ano, e com dois alunos bolsistas (PEC e PIBIC).

As pesquisas genéticas são essenciais na identificação de moléculas chaves envolvidas na etiologia da ELA. A identificação de mutações em genes associados a esta doença revelam novas perspectivas para o desenvolvimento da compreensão dos seus processos patológicos, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Considerando a inexistência de estudos brasileiros sobre a epidemiologia genética da ELA, os resultados deste projeto certamente trarão uma contribuição relevante para o entendimento da prevalência dos fatores genéticos associados a esta doença em nossa população.

Além disso, o diagnóstico molecular dos pacientes estudados poderá possibilitar um atendimento mais personalizado, assim como o aconselhamento genético familiar mais preciso.

Palavras-chave: Duplicação gênica; Esclerose Lateral Amiotrófica; Deleção; Doenças Neurodegenerativas; Fator de risco; Variação do número de cópias.

Avaliação e determinação do efeito inibitório de moléculas derivadas de microrganismos marinhos sobre os vírus Influenza A

Milene Miranda Accioly de Mesquita - Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo/IOC/Fiocruz

De acordo com dados da OMS as infecções agudas do trato respiratório representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo mundo. O principal agente viral causador destas infecções é o influenza A que ainda apresenta um potencial pandêmico; por isso, possui grande importância epidemiológica.

Os vírus influenza A, fazem parte da família *Orthomyxoviridae*, sendo compostos por RNA fita simples (RNAss), octa-segmentado, de polaridade negativa, envolvido por um capsídeo helicoidal e, externamente, por um envelope lipoprotéico, no qual estão inseridas as glicoproteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Este gênero viral pode ser encontrado numa ampla gama de animais e são subtipados de acordo com a sua combinação de HA (H1-H16) e NA (N1-N9). O rearranjo entre os segmentos do genoma de diferentes subtipos de influenza A e a vasta gama de hospedeiros possibilita o surgimento de novas variantes virais, *shift* viral, que podem ser transmitidas de forma sustentada na população humana promovendo grandes pandemias. A mais recente foi observada em 2009 provocada por um vírus de linhagem suína com rearranjo gênico de variantes humana e aviária, A(H1N1)pdm09.

O quarto fragmento genômico, contendo aproximadamente 1750nt, codifica a HA, sendo importante para a adsorção e fusão viral. A hemaglutinina é a porção mais antigênica da partícula viral, sendo a estrutura contra a qual os anticorpos neutralizantes são dirigidos, o que explica sua grande variabilidade.

Muitas dessas mutações, em seus cinco sítios antigênicos, mesmo silenciosas, são cumulativas, o que gera o chamado *drift* antigênico, originando cepas potencialmente epidêmicas. Em tese, a busca por novas drogas que atuem sobre esta enzima do vírus Influenza pode representar um importante advento terapêutico, pois poderia proporcionar um sinergismo entre a ação do sistema imunológico e o postulado quimoterápico antiviral.

O sexto fragmento genômico codifica a NA, que catalisa a clivagem de resíduos de ácido siálico de vírus Influenza recém montado e dos receptores celulares nas células hospedeiras, este processo é importante para a liberação viral e para a motilidade das partículas no trato respiratório.

Segundo dados da OMS durante as epidemias sazonais 20% da população é infectada pelo vírus influenza, com índice de hospitalização de 5 em cada mil indivíduos infectados e coeficiente de mortalidade anual médio de 2,02 por 10 mil habitantes.

Atualmente, além da vigilância epidemiológica dos vírus Influenza, são adotadas mais duas estratégias para o controle da circulação viral no mundo, sendo elas a vacinação anual anti-influenza e utilização de drogas antivirais.

A vacina anual é trivalente e administrada a grupos específicos da população como idosos, pacientes imunodeprimidos, gestantes e crianças até 2 anos de idade, dentre outros.

Dos compostos anti-influenza, destacam-se os inibidores de NA, como o zanamivir, administrado via inalação; e o oseltamivir (OST), administrado oralmente, sendo este último o principal antiviral utilizado na clínica. Porém, já foram descritos diversos isolados virais resistentes a este composto, inclusive de A(H1N1)pdm09.

Assim, o desenvolvimento de novos antivirais, capazes de inibir a replicação destes vírus selvagens e multi-resistentes podem representar uma estratégia ubíqua no tratamento das infecções pelo vírus influenza.

Nosso laboratório participa de rede internacional de laboratórios que analisa os vírus influenza no Brasil, atuando como laboratório nacional de referencia. Assim sendo, fazemos parte da rede responsável pela análise de resistência e genotipagem do influenza no Brasil.

Este projeto será desenvolvido em colaboração com pesquisadores do IOC, como os Drs. Thiago Moreno Lopes e Souza e Dumith Chequer Bou-Habib, que já apresentam uma continua produção na área de desenvolvimento e testagem de novos antivirais contra vírus de grande relevância clínica como o vírus Herpes simples tipo 1 (HSV-1) e o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1).

Além dos grupos anteriormente citados, também participa deste projeto o grupo chefiado pelo Dr. Fabiano Lopes Thompson, da UFRJ, que possui vasta experiência em estudos sobre a microbiota marinha e desenvolve pesquisas que envolvem a caracterização de produtos bioativos de microrganismos em parceria com o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

Em um primeiro momento está sendo preparada uma biblioteca de produtos naturais, oriunda de microrganismos marinhos. Os extratos resultantes serão caracterizados quimicamente e testados para avaliação da atividade antiviral.

A atividade antiviral será avaliada em relação a cepas de influenza A sazonais sensíveis e resistentes ao OST. Para tal, inicialmente serão avaliadas a toxicidade celular dos compostos e sua capacidade inibitória frente a isolados virais que serão expandidos em cultura de célula na presença e na ausência dos compostos. Faremos também o sequenciamento do genoma viral dos isolados expandidos na presença dos compostos para avaliarmos possíveis mutações induzidas pelo tratamento. Com os compostos mais promissores, temos como objetivo também, estudar os mecanismos de ação antiviral.

O sucesso de nosso projeto, de um ponto de vista mais pragmático, poderia suscitar alternativas no tratamento de vírus influenza resistentes ao oseltamivir ou atuar sinergisticamente com antivirais disponíveis para utilização clínica e, em se tratando de um composto desenvolvido no cenário nacional, evitaria gastos nacionais em saúde pública com *royalties* pagos a empresas farmacêuticas transnacionais.

Palavras-chave: Influenza A, compostos marinhos e atividade antiviral.

RNA interferente como ferramenta para supressão do vírus da hepatite B

PAULA, N. T.¹; LAMPE, E.¹.

¹ Laboratório de Hepatites Virais. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil.
Email: nayhanne.paula@ioc.fiocruz.br

O vírus da Hepatite B (HBV, família *Hepadnaviridae*) é responsável por um importante problema de saúde pública. A infecção por esses vírus é determinada pela interação entre componentes virais e resposta imune do hospedeiro, e vai de uma infecção aguda e auto-limitada a uma infecção crônica, que pode resultar em complicações como cirrose e carcinoma hepatocelular.

O HBV tem um genoma de DNA circular de 3,2 Kb e é dividido em 8 genótipos principais (A-H) - que podem ter um impacto na progressão da doença - com distintas distribuições geográficas. O tratamento de indivíduos crônicos é limitado, devido ao elevado custo, número de efeitos colaterais e baixa eficiência. Nesse sentido, novas abordagens terapêuticas têm sido avaliadas e o mecanismo de silenciamento gênico via RNA de interferência (RNAi) – processo natural envolvido na regulação de genes específicos - têm revelado resultados promissores. Esse mecanismo pode ser induzido pela expressão de construções quiméricas do tipo *short-hairpin* RNA (shRNA) em plasmídeos ou vetores virais e resultar em efetivo silenciamento de genes-alvo. O objetivo desse trabalho é utilizar a ferramenta de RNAi para silenciamento de diferentes proteínas do HBV. O RNAi poderá fornecer uma abordagem viável e inovadora com potencial aplicabilidade terapêutica. Esta tecnologia promissora representará uma nova linha de pesquisa no laboratório de Hepatites Virais (LAHEP) do Instituto Oswaldo Cruz, o que permitirá gerar conhecimento científico a respeito dos mecanismos de silenciamento pós-transcricional de genes de interesse do HBV.

Ecto-NTPDases como fatores de virulência de tripanosomatídeos

Otacílio da Cruz Moreira - Laboratório de Biologia Molecular e Doenças
Endêmicas/IOC/Fiocruz

Os tripanosomatídeos são protozoários que incluem espécies heteroxênicas patogênicas ao homem, como as do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, e patogênicas para plantas, como as dos gêneros *Phytomonas* e *Herpetomonas*, além de espécies não patogênicas que se desenvolvem estritamente no intestino de insetos, como as do gênero *Crithidia*. Estes parasitos causam impacto significativo na saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. A doença de Chagas é um problema endêmico grave que afeta milhões de pessoas nas Américas Central e do Sul. Estima-se que cerca de 8 milhões de pessoas desta região estejam infectadas e que a doença cause de 10 a 14 mil mortes por ano (Rassi Jr., 2012).

O acometimento cardíaco é uma das principais causas de morte por problemas cardiovasculares nestas áreas (Dias e colaboradores, 2002). Os tradicionais antiparasitários, nifurtimox e benzonidazol, além de causarem diversos efeitos colaterais, são parcialmente eficazes, e apenas na fase aguda da infecção (Cançado, 1985).

As diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* envolvidas na infecção e sua distribuição regional têm sido aventadas como causa de diferentes apresentações clínicas, respostas aos métodos diagnósticos e eficácia terapêutica (Andrade e colaboradores, 1985). Em adição, a *Leishmaniose* é uma doença parasitária de alcance mundial, com aproximadamente 12 milhões de casos nas regiões tropicais e temperadas (OMS, 2009). As formas mais predominantes da doença em humanos são a Leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é o agente etiológico da leishmaniose cutânea difusa e disseminada, que é caracterizada por um decréscimo na resposta imune do paciente infectado (Convit e cols., 1972; Barral e cols., 1991). A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o agente etiológico da Leishmaniose mucocutânea, doença caracterizada pelo desenvolvimento de úlceras cutâneas (raramente múltiplas), expansivas e persistentes, frequentemente acompanhadas de lesões graves da nasofaringe. Apesar da prevalência mundial e do elevado número de casos, existiram poucos avanços na quimioterapia nos últimos anos. As ecto-NTPDases são enzimas que estão presentes na face externa da membrana plasmática, hidrolisando nucleotídeos tri- e di- fosfatados, como o ATP e ADP (Zimmermann, 1999; Plesner, 1995), sendo importantes no processo de aquisição de purinas pelos tripanosomatídeos. Recentes estudos mostram uma estreita relação entre a atividade de ecto-NTPDases e a infectividade do *Trypanosoma cruzi* e *Leishmanias*, sugerindo que estas enzimas possam ser bons alvos para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento das doenças causadas por estes parasitas. Diante da problemática observada para o controle destas doenças,

fazem-se necessários maiores estudos sobre o metabolismo de seus agentes etiológicos, em busca de alvos mais eficientes para a quimioterapia. Neste sentido, pretendemos utilizar diferentes estratégias moleculares, como sequenciamento de DNA, PCR em tempo real e interferência de RNA para investigar o papel de ectoenzimas na virulência e infectividade de *T. cruzi*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, através da análise comparativa dos níveis de expressão da ecto-NTPDase-I em diferentes formas evolutivas e diferentes subpopulações de *T. cruzi*, da caracterização molecular e análise da expressão da ecto-NTPDase de *L. amazonensis* em cepas virulentas e avirulentas e do silenciamento do gene da ecto-NTPDase, por interferência de RNA, para a investigação da virulência e infectividade em *L. braziliensis*. Assim, pretendemos gerar conhecimento a respeito do papel desta enzima na infectividade e virulência dos tripanosomatídeos, avaliando o potencial da mesma como possível alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento da Doença de Chagas e Leishmanioses.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis*, ecto-NTPDase, expressão gênica, virulência, infectividade.

Avaliação do efeito de compostos 1*H*-1,2,3-triazólicos sobre a atividade de glicosidases comerciais

Rafael Ferreira Dantas - Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos/IOC/Fiocruz

As glicosidases (E.C. 3.2.1.x) são enzimas encontradas amplamente nos seres vivos que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas entre di, oligo e polissacarídeos e glicoconjugados. Participam de diversos eventos biológicos importantes, como a captação e armazenamento de energia, a expansão e degradação da parede celular e o *turnover* de moléculas envolvidas na sinalização. Isto tem estimulado o desenvolvimento de inibidores de glicosidases para serem utilizados como fármacos no tratamento de diversos tipos de doenças, como diabetes, distúrbios de armazenamento lisossomal, infecções virais e câncer. Na última década a introdução da química *click* possibilitou o desenvolvimento de novos compostos conjugados com o núcleo 1*H*-1,2,3-triazólico. Muitos desses compostos apresentam atividade biológica (ex: ação antitumoral e antiviral) e alguns atuam como inibidores de glicosidases, em especial os glicoconjugados. Sendo assim, o núcleo 1*H*-1,2,3-triazol representa uma base molecular para a síntese de inúmeros tipos de derivados que podem ser avaliados quanto a sua capacidade de inibir glicosidases. O objetivo principal deste projeto é identificar potentes inibidores de glicosidases a partir de diferentes séries de derivados 1*H*-1,2,3-triazólicos. A estratégia inicial de trabalho consistirá na avaliação dos efeitos dos derivados triazólicos sobre a atividade de glicosidases comerciais. Tais enzimas representam diferentes famílias de glicosidases e indicarão quais enzimas de mesma família com relevância fisiopatológica também poderiam ser alvos desses compostos. Os ensaios enzimáticos serão realizados por técnicas de espectrofotometria e permitirão não só identificar os compostos inibidores, mas também determinar parâmetros cinéticos de inibição, como o valor de IC₅₀, K_i e o tipo de inibição. Espera-se neste projeto identificar potentes inibidores de glicosidases que auxiliem no desenvolvimento racional de novos fármacos. Os resultados serão usados na elaboração de trabalhos acadêmicos de graduação e pós-graduação assim como na publicação de artigos científicos. Em virtude do potencial farmacológico destes inibidores é possível que patentes sejam requeridas.

Estruturação das populações de *Aedes aegypti* no Rio de Janeiro – um estudo preliminar para a implementação do programa ‘Eliminate Dengue’ no Brasil

Renata Schama Lellis - Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas/IOC/Fiocruz

No Brasil, como resultado da pressão de seleção pelo uso de inseticidas químicos contra o *Aedes aegypti*, a resistência está se disseminando em várias populações do vetor, situação que compromete os programas de controle. Por outro lado, novas estratégias de controle que envolvem a liberação de mosquitos em campo com o objetivo de suprimir ou de substituir as populações naturais, estão ganhando impulso atualmente. Tanto a implementação efetiva deste tipo de metodologia quanto a utilização racional de inseticidas dependem de conhecimento detalhado sobre o tamanho, a estrutura e as taxas de migração das populações alvo. O objetivo deste projeto é estudar a estruturação populacional e o fluxo gênico entre populações naturais de *A. aegypti* no Rio de Janeiro como pré-requisito para a implementação do programa ‘Eliminate Dengue’ no Brasil. Este programa pretende implementar a estratégia de infecção do vetor com a bactéria *Wolbachia* visando eliminar a transmissão do vírus dengue. Serão feitas no total três coletas em 20 regiões do estado, com foco principal na região metropolitana do Rio de Janeiro e em Niterói, onde a eventual soltura de animais infectados deve ocorrer. Serão usadas ovitrampas (armadilhas de coleta de ovos) para obtenção de dados, que serão analisados utilizando nove loci de microssatélites previamente desenvolvidos para as análises populacionais. Serão ainda avaliados o grau de parentesco dos espécimes capturados em uma mesma armadilha, a variabilidade do comportamento de postura entre as populações do vetor e o efeito da distância geográfica sobre este comportamento e sobre a estrutura genética das populações. Com isto pretendemos obter um maior conhecimento sobre a estrutura populacional do vetor da dengue no estado. Pretendemos avançar na elucidação de uma série de aspectos da biologia de *A. aegypti*, de forma a subsidiar decisões relativas tanto ao manejo da resistência a inseticidas quanto à implementação no país de estratégias de controle do vetor baseadas na liberação de espécimes em campo. Vários laboratórios estão envolvidos neste projeto que está inserido dentro do grande projeto “Eliminate dengue” no Brasil. Participam deste trabalho membros de outros laboratórios do IOC/Fiocruz (Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus e Laboratório de Transmissores de Hematozoários), do Centro de Pesquisas René Rachou e da Universidade de Melbourne, na Austrália.

Palavras-chave: Eliminate Dengue, *Aedes aegypti*, *Wolbachia*, genética de populações, estruturação genética, variação sazonal, Rio de Janeiro, métodos de controle, vetores

Estruturação das populações de *Aedes aegypti* no Brasil e sua implicação no controle populacional do vetor

Renata Schama Lellis - Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas/IOC/Fiocruz

No Brasil, como resultado da pressão de seleção, com o uso de inseticidas químicos contra *Aedes aegypti*, a resistência está se disseminando em várias populações do vetor, situação que compromete os programas de controle. Enquanto novas metodologias de controle não estão bem estabelecidas, a utilização racional de inseticidas depende de conhecimento detalhado sobre o tamanho, a estrutura e as taxas de migração das populações alvo. O objetivo deste projeto é estudar a estruturação populacional e o fluxo gênico entre populações naturais do mosquito *Aedes aegypti* no Brasil e correlacionar estas informações com o status e os mecanismos de resistência aos inseticidas usados na rotina do controle. Para isto, determinaremos a estrutura genética, a resistência e os mecanismos envolvidos em quatro populações do vetor, representativas das regiões N, NE, SE e CO do país. Para cada localidade já foram feitas no total 2 coletas, representativas do inverno e do verão. Serão usadas armadilhas de postura (ovitrampas), dispostas em três áreas de 1 km² por localidade. Avaliações da resistência e de seus mecanismos serão realizadas de acordo com os protocolos padrão usados no país. Para as análises populacionais serão utilizados marcadores neutros: 12 microssatélites previamente desenvolvidos e dois loci de EPICs. Serão ainda avaliados o grau de parentesco dos espécimes capturados em uma mesma armadilha, além da variabilidade do comportamento de postura entre as populações do vetor, e o efeito da distância geográfica sobre este comportamento e sobre a estrutura genética das populações. Finalmente, alguns genes potencialmente envolvidos com a resistência metabólica serão identificados, por meio de abordagem que integra a bioinformática, a bioquímica, a biologia molecular e análises funcionais. Estes serão também utilizados como marcadores, e servirão para investigar em detalhe a relação de enzimas detoxificantes com a resistência a diferentes classes de inseticidas. Pretendemos avançar na elucidação de uma série de aspectos da biologia de *A. aegypti*, de forma a subsidiar decisões relativas tanto ao manejo da resistência a inseticidas quanto à implementação no país de estratégias de controle do vetor baseadas na liberação de espécimes em campo. Este trabalho está sendo feito em colaboração com o Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores e o Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, genética de populações, microssatélites, variação sazonal, estruturação genética.

Abordagem Bioinformática para o estudo da resistência a inseticidas em insetos vetores

Renata Schama Lellis - Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas/IOC/Fiocruz

Atualmente, o combate aos mosquitos vetores consiste em medidas contra as larvas e adultos. Apesar do reconhecimento crescente da importância do controle físico, com a remoção dos criadouros e a participação da população, o controle químico ainda tem papel significativo no combate ao vetor. Historicamente, quatro classes de inseticidas químicos que atuam no sistema nervoso central dos mosquitos (organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides) são usadas. O emprego desses inseticidas vem submetendo os mosquitos a uma intensa pressão seletiva, com o surgimento de populações de insetos resistentes. Existem três formas documentadas de resistência a inseticidas em mosquitos vetores: a) mutações no sítio de ação do inseticida (“resistência do sítio alvo”), b) mudanças de expressão e mutações nos genes que codificam enzimas detoxificantes (“resistência metabólica”), e c) mudanças de expressão e mutações nos genes relacionados com a formação da cutícula. Dentre estas, as mais comuns são as duas primeiras. As enzimas que participam da resistência metabólica desempenham um importante papel na adaptação das espécies aos seus nichos ecológicos específicos. Cada ambiente exibe uma variedade de componentes tóxicos aos quais os organismos estão expostos. Estes compostos devem ser metabolizados e excretados em um processo que ocorre em três fases, mediadas pela ação de enzimas específicas. Na Fase I ocorre uma modificação química do xenobiótico, na Fase II o xenobiótico pode ser conjugado a outros compostos, para torná-lo mais solúvel e na Fase III ocorre a excreção do xenobiótico para fora do ambiente celular. As principais classes de enzimas que atuam neste processo são as esterases e monooxigenases (Fase I) e as glutathione-S-transferases (Fase II). O Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetore, colaborador deste projeto, detém a metodologia de análises bioquímicas para a investigação da resistência metabólica a inseticidas. Com este trabalho, um grande conhecimento sobre a atividade bioquímica dessas enzimas detoxificantes foi construído e questionamentos quanto à efetividade dos protocolos bioquímicos utilizados para se determinar as causas da resistência foram sendo feitos. Uma característica interessante dessas enzimas detoxificantes é que são codificadas por genes pertencentes a famílias gênicas que variam em tamanho e número entre as diferentes espécies de artrópodes. Apesar do número limitado de mecanismos encontrados até hoje, a diversidade das famílias gênicas envolvidas no metabolismo de substâncias tóxicas parece contribuir significativamente para o aparecimento de resistência às diversas classes de inseticidas.

A bioinformática se aplica como ferramenta para a comparação de sequências homólogas de tais famílias gênicas, sendo a análise filogenética uma metodologia importante para o estudo da evolução desses genes na história do grupo. Além disso, através da análise de clados funcionais, dos sítios ativos, das assinaturas dessas enzimas e da identificação de períodos de pressão seletiva e adaptação, podemos obter uma maior compreensão sobre a função e forma de ação das isoformas. Este projeto tem colaborações de membros de outros laboratórios do IOC/Fiocruz (Laboratório de Fisiologia e Controle de Artrópodes Vetores, Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus e Laboratório de Bioquímica, Fisiologia e Imunologia de Insetos) e fora da instituição, na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: Carboxilesterases, resistência a inseticidas, phosphotriesterases, artrópodes, filogenômica, evolução de famílias gênicas, CCE, PTE

Produção de anticorpos IgY anti-norovírus utilizando *virus-like particles* para desenvolvimento de ensaio imuno-enzimático *in house*

Tulio Machado Fumian - Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental/IOC/Fiocruz

A gastroenterite aguda (GA) continua sendo um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Estima-se que ocorram anualmente mais de 700 milhões de casos de GA no mundo, causando cerca de 1,24 milhão de mortes em crianças menores de cinco anos, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2009; Tate et al., 2012). Dentre os agentes causadores da GA, os norovírus (NoV) figuram entre os patógenos mais importantes (Fankhauser et al., 2002; Patel et al., 2009; Lopman et al., 2012), causando mais de 90% dos surtos não bacterianos no mundo, com aproximadamente 200.000 mortes em crianças menores de cinco anos nos países em desenvolvimento (Vinje et al., 2004; Patel et al., 2008).

Os NoV pertencem a família *Caliciviridae*, gênero *Norovirus*. Apresentam genoma de RNA fita simples e polaridade positiva, contendo três fases de leitura aberta (ORFs): ORFs 1, 2 e 3. A ORF-1 codifica uma poliproteína, que após a clivagem proteolítica, dá origem as proteínas não estruturais. A ORF-2 codifica a proteína principal do capsídeo (VP1) e a ORF-3 codifica a proteína menor do capsídeo viral (VP2) (Atmar & Estes 2001; Hardy 2005). A clonagem e expressão da ORF-2 em sistema baculovírus/células de inseto torna possível a obtenção de partículas semelhantes a vírus, VLPs (do inglês *virus-like particles*), sendo essas antigênica e morfológicamente similares às partículas de NoV, contudo sem a presença do RNA genômico.

As VLPs de NoV são utilizadas na produção de anticorpos do tipo monoclonal e policlonal, necessários para desenvolvimento e padronização de ensaios imuno-enzimáticos (EIEs) utilizados para diagnóstico rápido destes agentes virais (Jiang et al., 1992; Green et al., 1993; Kobayashi et al., 2000; Yoda et al., 2003; Okame et al., 2007).

Em relação aos NoVs, o diagnóstico molecular é considerado padrão ouro, com a detecção do RNA viral por transcrição reversa seguida de PCR qualitativo (RT-PCR) ou quantitativo em tempo real RT-qPCR (Kageyama et al., 2003; Gray et al., 2007). Apesar da disponibilidade e sensibilidade destes ensaios, os mesmos não são automatizados demandam tempo e espaço laboratorial amplo, assim como exigem pessoal altamente qualificado. Em contraste com os ensaios moleculares, a metodologia do Ensaio Imuno-enzimático (EIE) apresenta algumas vantagens como a fácil execução, diminuindo a necessidade de equipamentos e espaços laboratoriais complexos, possibilitando a obtenção de resultados em curto espaço de tempo. A escassez de metodologias desse tipo leva à necessidade de importação de Kits comerciais, o que eleva o custo dos ensaios e inviabiliza a utilização em larga escala no Brasil. Estudos direcionados para desenvolvimento e aperfeiçoamento deste tipo de ensaio de diagnóstico são necessários para o melhor entendimento epidemiológico da doença

causada por estes agentes virais. Uma alternativa a este opção de desenvolvimento de EIEs é a utilização da imunoglobulina Y (IgY) específica para NoV.

É crescente o interesse na utilização da imunoglobulina Y de gema de galinhas para fins de imunoterapia, imunodiagnóstico e em casos de inibição da rejeição em xenotransplante (Fryer et al., 1999; Tini et al., 2002). Somente dois artigos científicos abordam os NoV e a produção de IgY, e resultam do trabalho de cooperação entre um grupo Norte Americano e Chinês que utilizaram a partícula P dos NoVs (pequena fração da proteína de capsídeo VP1) para produzir IgY (Dai et al., 2012; 2013).

Isolada da gema do ovo desses animais (Leslie et al., 1969; Hadge et al., 1984), a IgY difere estruturalmente da IgG de mamíferos, tendo concentração maior na gema quando comparada ao soro (Rose et al., 1974; Larsson et al., 1993). As IgYs são produzidas no sangue das aves e transferidas para os ovos durante o desenvolvimento do embrião (Xu et al., 2011).

A tecnologia de IgY (Fischer et al., 1996) apresenta várias vantagens sobre a utilização de IgG: (i) não há sangria do animal, pois somente a coleta dos ovos é necessária após a imunização; (ii) são descritos diferentes métodos rápidos e simples para o isolamento da IgY em larga escala; (iii) maior avidéz e menor reatividade cruzada; (iv) a manutenção das aves é de baixo custo; e (v) são necessárias pequenas quantidades de antígeno para obtenção de altos e duradouros títulos de IgY na gema do ovo de aves imunizadas (Gassmann et al., 1990; Xu et al., 2011). Ao longo da vida, uma ave gera em torno de 280 ovos/ano e a gema de ovo geralmente contém 150 – 200 mg de IgY e, cerca de 2 – 10% destes, consistem em anticorpos específicos. Portanto, uma galinha pode ser considerada uma pequena “fábrica” de produção de anticorpos (Nguyen et al., 2010).

O LVCA atua como Laboratório de Referência Regional em rotavíruses, CGLAB, Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Ministério da Saúde (MS) e recebe amostras fecais de 11 estados federativos: RS, SC, RJ, MG, ES, BA, SE, PB, AL, PE e MA. Há também uma coleção de amostras disponíveis no LVCA, recebidas desde o ano de 1996, onde atualmente o diagnóstico para NoV é realizado por metodologias moleculares (RT-PCR e RT-qPCR). É frequente o recebimento de amostras de surtos de GA provenientes de diferentes locais, como navios de cruzeiro, tribos de indígenas e creches, por exemplo. A disponibilidade de um EIE para o diagnóstico rápido, principalmente nos casos de surtos de GA, seria de grande importância na investigação dos NoV.

Palavras-Chave: Norovírus, Imunoglobulina Y, gastroenterite aguda, ensaio imunoenzimático.

Estudo da dispersão do vírus vacinal da Febre Amarela em modelos experimentais

Patricia Carvalho de Sequeira

Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus / IOC / FIOCRUZ

A vacina da Febre Amarela cepa 17D (FA 17D) vem sendo usada há mais de 70 anos para a imunização de humanos. Esta vacina é uma cepa atenuada do vírus da Febre Amarela e tem se mostrado uma das mais eficazes e seguras, capaz de promover a soroconversão de mais de 90% dos vacinados e gerar uma resposta imune ampla e de longa duração. O nosso grupo utiliza o vírus FA17D como vetor de expressão, através da inserção de sequências heterólogas entre as regiões E e NS1 do vírus. Pouco se conhece sobre a capacidade de dispersão e proliferação do vírus FA17D. Este projeto tem como objetivo a investigação do perfil de dispersão e proliferação de vírus vacinal da Febre Amarela em diferentes modelos experimentais. Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, foi realizada a inserção do gene de GFP no genoma do vírus FA17D. Esta estratégia teve o intuito de facilitar o monitoramento da infecciosidade e direta visualização da síntese desta proteína em culturas de células transfectadas com o RNA viral, através de microscopia de fluorescência. Estudos anteriores de nosso grupo mostram também que em camundongos BALB/c vacinados, o vírus tem ampla capacidade proliferativa, tendo sua carga viral detectada por qRT-PCR em amostras de soro e órgãos como linfonodo drenante, fígado, baço e pele até o 7^o dia após a vacinação. Em colaboração com o Laboratório de Patologia do IOC, estudos preliminares de RT-PCR semi-nested, mostraram que o RNA de vírus recombinante FA17D contendo o gene de GFP é encontrado em diferentes órgãos de embrião de galinha, após inoculação de ovos embrionários. Estudos complementares através da infecção *in vitro* de cultura de fibroblastos de embrião de galinha estão em andamento para determinarmos a cinética de infecção deste tipo celular. Através da determinação do perfil proliferativo do vírus vacinal da Febre Amarela em diferentes modelos experimentais, esperamos gerar ferramentas que nos possibilitem melhor compreender os mecanismos de imunidade gerada pelo vírus FA17D e consequentemente, desenvolver vírus recombinantes com mais alta capacidade imunogênica.



IOC
Instituto Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

