

CICLO CARLOS CHAGAS

DE PALESTRAS

3ª EDIÇÃO

LIVRO DE RESUMOS

Apoio



Realização



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Auditório Emmanuel Dias do Pavilhão Arthur Neiva (Cursos do IOC)

PROGRAMA

**106 ANOS APÓS A DESCOBERTA: O TEMPO NÃO PARA
DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO, TERAPIA E INCLUSÃO DO PORTADOR DA DOENÇA DE CHAGAS**

ORGANIZADORES: CONSTANÇA BRITTO & JOSELI LANNES

09 de abril de 2015

Manhã

8:15 - 8:50h È Crachas

09:00 È 09:30hs Abertura

Presidência da Fiocruz, Diretoria do IOC e Organizadores

Simone Kropf / COC

Homenagem ao Professor Joffre Marcondes de Rezende

09:30 - 10:15h

Marco Krieger / Instituto Carlos Chagas/Fiocruz

Diagnóstico na doença de Chagas: entraves, avanços e desafios

10:15 - 10:30h Coffee Break

10:30 - 10:40h

Debatedora: Lucia Brum / MSF

10:40 - 11:10h

Constança Britto / Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Avanços no diagnóstico molecular da doença de Chagas com aplicação na avaliação de eficácia terapêutica

11:20 - 12:00h

Sergio Sosa-Estani / INP Dr Mario Fatala Chaben Argentina

Controle da doença de Chagas na Argentina: Diagnóstico e Terapia

12:15 - 14:00h Intervalo de Almoço

Tarde

14:00 - 14:40h

Rafael Rodrigues È 2 minutos de prosa poética

Andrea Silvestre Sousa / INI Evandro Chagas/Fiocruz

Forma cardíaca da doença de Chagas e suas comorbidades: avanços e desafios no tratamento

14:45 - 15:15h

Renato Vieira / SVS / MS

Cenário da doença de Chagas no Brasil em 2015 e desafios para 100+10 (2019)

15:20 - 15:40h Coffee Break

15:40 - 16:20h

José Rodrigues Coura / Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Desafios da doença de Chagas na região amazônica: visão atual e cenário para 2020

Orquestra de Câmara da Ilha do Governador (Pausa Musical)

16:35 - 17:40h Sessão de Pôsteres

17:40 - 18:30h Talent Section

Manhã - Centro de Estudos Especial

09:00 - 10:00h

Fernando Genta Ë 2 minutos de prosa poética

Apresentação dos 3 trabalhos selecionados

Díaz-Albiter et al.

Phytophagy in Triatomines: the Missing Link in the Eco-epidemiology of Chagas Disease

Souza et al.

Desenvolvimento de um protótipo de kit para o diagnóstico molecular e avaliação da carga parasitária em pacientes com Doença de Chagas

Barros et al.

Distribuição geográfica e diversidade de hospedeiros de T. cruzi DTUs TcIII e TcIV em diferentes biomas brasileiros

10:00 - 10:10h

Debatedora: Lucia Brum / MSF

10:10 - 10:50h

Desafios de inclusão do portador da doença de Chagas

Tania C. Araújo-Jorge / IOC

11:00 - 11:40h

Faustino Torrico Ë Universidad Mayor de San Simon/Bolivia

Doença de Chagas na Bolívia: o que preocupa?

11:50h-12:00h

Entrega de Prêmio aos melhores trabalhos

Encerramento

Aspectos clínicos, estudos de polimorfismos genéticos

Resumo 109

Polimorfismo do gene de TGF- β 1 e a correlação com a susceptibilidade da doença de chagas

Roberto Rodrigues Ferreira¹, Renata Almeida de Sá¹, Aline dos Santos Moreira¹, Tania de Araújo-Jorge², Jean Jacques Feige³, Sabine Bailly³, Leila Mendonça-Lima¹, Wim Degraeve¹, Fabiana Madeira⁴, Gabriel Alvez⁴, Roberto Magalhães Saraiva⁴, Mariana Caldas Waghabi¹

¹Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática. ²Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos - Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro RJ, Brazil. ³INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), U878, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France. ⁴Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro RJ, Brazil.

Estudos desenvolvidos pelo grupo nos últimos anos demonstram o envolvimento do fator transformador de crescimento beta (TGF- β) na cardiopatia chagásica, com exacerbação dos seus níveis plasmáticos e da ativação da sua via de sinalização celular como aspectos desenvolvidos por pacientes nos estágios mais avançados da doença, associado também a níveis elevados de fibrose. Pacientes que apresentavam altos níveis de TGF- β circulantes, após 10 anos de acompanhamento, evoluíram com pior prognóstico da doença. Recentemente, o polimorfismo no códon 10 do gene que codifica o TGF- β 1 foi descrito por influenciar na produção desta citocina. Também foi observado que, em populações da Colômbia e do Peru, o mesmo polimorfismo pode estar envolvido na susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi*. O presente trabalho avaliou o polimorfismo dos alelos do gene do TGF- β 1 em pacientes na fase crônica da doença de Chagas; incluindo a forma indeterminada e os diversos estágios da forma cardíaca e correlacionou a expressão dos diferentes alelos do TGF- β 1 com os níveis séricos desta citocina e a manifestação clínica da doença de Chagas. Para isso, 181 indivíduos entre pacientes com forma indeterminada ou cardíaca e controle foram convidados a participar do trabalho. Análises de cinco polimorfismos de base única (-800 G>A, -509C>T, +10T>C, +25G>C e +263C>T) foram realizadas por PCR e sequenciamento dos fragmentos do gene de TGF- β 1. Além disso, o nível sérico desta molécula foi dosado por ELISA. Ao analisar a frequência genotípica nos diferentes polimorfismos, observamos que a frequência do polimorfismo na posição -509 e no códon 10 eram maiores em pacientes portadores da doença que em indivíduos controle. Além disso, os genótipos CT e TT na posição -509 estão associados com altos níveis séricos do TGF- β 1. Desta forma, nossos resultados sugerem que os polimorfismos genéticos na posição -509 e no códon 10 do gene TGF- β 1 podem estar envolvidos na susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* na doença de Chagas.

Biologia celular e interação parasito/célula hospedeira

Resumo 055

Alterações no perfil de glicosilação na superfície de linfócitos T durante a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Leonardo Alexandre de Souza Ruivo^{1,2}, Glaucia Vilar Pereira¹,
Isabela Resende Pereira¹, Leonardo Marques da Fonseca²,
Lucia Mendonça Previato², José Osvaldo Previato², Joseli Lannes Vieira¹

¹Laboratório de Biologia das Interações . Instituto Oswaldo Cruz . FIOCRUZ

²Laboratório de Glicobiologia . Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

A superfície dos organismos vivos é recoberta por moléculas de carboidratos nas quais está presente um terminal não redutor composto por unidades de ácido siálico (Neu5Ac). A presença de ácido siálico é biologicamente significativa. Neu5Ac está intimamente envolvido em mecanismos moleculares de reconhecimento celular, interação parasito-hospedeiro, tráfego de linfócitos e regulação do sistema imune. Células não ativadas do sistema imune, como os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, apresentam em sua superfície glicoconjugados contendo Neu5Ac terminal. Quando ativadas, essas células perdem o terminal siálico, perfil este associado a fenótipo efetor. O *Trypanosoma cruzi* possui em sua superfície e libera no plasma do hospedeiro a *trans*-sialidase, uma enzima unicamente encontrada neste gênero e que catalisa a transferência de ácido siálico de moléculas doadoras, Neu5Ac- 2-3Galp -, para terminais receptores contendo Galp-, formando exclusivamente ligações do tipo 2. 3 na superfície do parasito ou, alternativamente, na superfície de células do sistema imune. Neste trabalho estudamos o padrão (frequência de células e densidade na superfície) de ligação de lectinas em células T CD4⁺ e CD8⁺ nas fases aguda e crônica da infecção pelo *T. cruzi*. Estudamos a ligação de PNA (*Peanut agglutinin, Arachis hypogaea*, se liga a terminal Gal 1-3GalNAc 1-Ser/Thr), SNA (*Elderberry lectin, Sambucus nigra*, que se liga a Neu5Ac 2-6Gal(NAc)-R) e MAL (*Maackia amurensis leukoagglutinin, Maackia amurensis*, que se liga a Neu5Ac/Gc 2,3Gal 1,4Glc(NAc)). **Metodologia:** Fêmeas da linhagem C57BL/6 foram infectadas intraperitonealmente com 100 tripomastigotas sanguíneos da cepa Colombiana de *T. cruzi*. Baços foram coletados em diferentes pontos da infecção e analisados por citometria de fluxo. **Resultados e Conclusões:** Nossos resultados preliminares demonstram que na fase crônica da infecção (120 dias após infecção) há aumento da frequência de células T CD4⁺PNA⁺ e T CD8⁺PNA⁺, assim como da densidade expressão de ligantes para lectina PNA. Por outro lado, a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ que expressam ligantes para lectinas SNA e MAL foi reduzida. Assim, os perfis de glicosilação da superfície das células T CD4⁺ e CD8⁺ talvez sejam impressões digitais de ativação específica na infecção pelo *T. cruzi*, podendo estar relacionadas a mecanismo de escape do parasito ao sistema imune do vertebrado.

Apoio: CNPq, FAPERJ

Biologia celular e interação parasito/célula hospedeira

Resumo 083

Neutrófilos na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: estratégias de isolamento e purificação

Isabella Forasteiro Tavares, Joseli Lannes-Vieira, Verônica Schmitz

Laboratório de Biologia das Interações, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro.

A fase crônica da doença de Chagas (DC) é um grande desafio para saúde pública dos países da América Latina. A forma cardíaca da DC é a principal causa de incapacidade e morte. O papel de neutrófilos na defesa contra o *Trypanosoma cruzi* foi demonstrado devido à capacidade destes de fagocitar e destruir amastigotas *in vitro* e também de induzir citotoxicidade mediada por anticorpos. O papel de neutrófilos em vários modelos experimentais é bastante controverso, pois estes são considerados células efetoras da imunidade inata, mas também podem contribuir para exacerbação da inflamação contribuindo para produção de citocinas pró-inflamatórias e hipóxia tecidual. O aperfeiçoamento de metodologias de purificação de neutrófilos murinos com alto grau de pureza é uma ferramenta necessária para estudos *in vitro* e *in vivo* que possam ajudar na melhor compreensão do papel de neutrófilos na forma cardíaca da DC. O objetivo inicial desse trabalho foi desenvolver estratégias de purificação de neutrófilos murinos de camundongos C57BL/6 infectados com *T. cruzi* da cepa Colombiana. Os neutrófilos foram isolados da medula óssea e três metodologias diferentes foram utilizadas para a purificação: (i) gradiente descontínuo de Percoll, (ii) gradiente de Ficoll seguido de sedimentação em dextran e (iii) microesferas imunomagnéticas por seleção negativa. A análise morfológica foi feita em lâminas de citospin e as células foram coradas pelo método do Panótico rápido. A pureza das preparações foi avaliada através de citometria de fluxo utilizando anticorpos anti-CD11b e GR-1, moléculas utilizadas para caracterização fenotípica de neutrófilos. A análise morfológica comparativa entre os métodos de purificação por gradientes revelou que as culturas após o Percoll tiveram um maior enriquecimento, sendo este método que obteve células com características morfológicas mais compatíveis com neutrófilos. Na literatura, vários trabalhos apontam as desvantagens do uso de gradientes descontínuos para isolamento de neutrófilos, portanto resolvemos investir na seleção negativa. A análise microscópica das células apontou para enriquecimento compatível entre os métodos de Percoll e a seleção negativa. O grau de pureza de ambos foi de aproximadamente 90% das células eram CD11b⁺Ly6G⁺, fenótipo este compatível com neutrófilos. Em resumo, a escolha do melhor método dependerá do tipo de ensaio que será utilizada a preparação celular. No caso de estudos que avaliem a expressão de antígenos de superfície e avaliação de subpopulações neutrofílicas a seleção negativa possui vantagens, uma vez que este método não é capaz de mobilizar antígenos de superfície de localização intracelular.

Apoio financeiro: Proep-CNPq, Faperj e Fiocruz.

Biologia celular e interação parasito/célula hospedeira

Resumo 084

INTERFERON-GAMA PROMOVE A INFECÇÃO DE ASTRÓCITOS MURINOS PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* VIA FATOR DE NECROSE TUMORAL

Silva RR, Mariante RM, Silva AA, Brandão J, Dos Santos AL, Lannes-Vieira J.

Laboratório de Biologia das Interações/IOC/Fiocruz-RJ;

rafaelrs@ioc.fiocruz.br

O comprometimento do sistema nervoso central (SNC) na doença de Chagas (DC) é caracterizado dentre outros por meningoencefalite e alterações comportamentais. Em indivíduos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* e imunocomprometidos, reativação da infecção ocorre preferencialmente no SNC. Porém, os alvos celulares do *T. cruzi* e os mecanismos que favorecem sua persistência no SNC, bem como a origem dos parasitos em episódios de reativação na infecção crônica não estão claros. Os astrócitos (as células gliais mais abundantes do SNC humano) já foram mostrados serem suscetíveis à infecção, mas sua participação na DC carece de informação. Além disso, o papel de citocinas como interferon-gama (IFN) no processo de infecção pelo *T. cruzi* no SNC não foi ainda estudado. Neste trabalho, investigamos os efeitos de IFN sobre a infecção de astrócitos pelo *T. cruzi*, através da análise das taxas de infecção e da produção de mediadores inflamatórios. Utilizamos cultivos primários de astrócitos (acima de 95% de enriquecimento) de animais C3H/He e C57BL/6, tratados ou não com IFN antes ou após a infecção com tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi*. Confirmamos que astrócitos são suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi*. As taxas de infecção sofreram influência do tempo de interação e da relação parasito-célula hospedeira (MOI), sendo aumentadas pelo tratamento com IFN (antes e após infecção). IFN favoreceu a infecção em astrócitos de ambas as linhagens em estudo, mas esse efeito não foi observado em fibroblastos murinos (linhagem L929). Dois sinais (IFN + *T. cruzi*) foram necessários para indução de baixos níveis de produção de óxido nítrico (NO) por astrócitos. O tratamento com L-NAME (inibidor da síntese de NO) reduziu parcialmente o número de amastigotas em astrócitos tratados com IFN . Finalmente, o tratamento dos astrócitos com Infliximab (anticorpo neutralizante anti-TNF) preveniu completamente o efeito de IFN no favorecimento à infecção de astrócitos pelo *T. cruzi*. Estes dados sugerem que IFN atue como um combustível para a infecção de astrócitos pelo *T. cruzi*. Estes astrócitos infectados na presença de IFN agiriam como fontes de TNF e NO, o que poderia contribuir para a persistência do parasito e patologia do SNC na DC.

Suporte Financeiro: CAPES, CNPq, POM-Fiocruz, INCTV.

Biologia celular e interação parasito/célula hospedeira

Resumo 101

ASTRÓCITOS HUMANOS DA LINHAGEM U87MG GERAM AMBIENTE INFLAMATÓRIO APÓS INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Brandão J, Silva RR, Mariante RM, Lannes-Vieira J.

Laboratório de Biologia das Interações/IOC/Fiocruz-RJ;

rafaelrs@ioc.fiocruz.br

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) na doença de Chagas (DC), embora ainda não seja consenso entre os pesquisadores, é descrito especialmente em recém-nascidos e crianças abaixo de dois anos de idade, bem como durante a reativação da infecção em indivíduos imunocomprometidos pela co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os alvos celulares do *Trypanosoma cruzi* no SNC, bem como os mecanismos pelos quais esse parasito persiste nesse tecido e sua origem em episódios de reativação na infecção crônica não estão claros. Os astrócitos são as células gliais mais abundantes do SNC humano, onde participam da formação da barreira hemato-encefálica, dão suporte físico e mantém a homeostase cerebral; e, embora tenham sido mostrados serem suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi*, sua participação na DC carece de informação. Neste estudo, investigamos a suscetibilidade de astrócitos humanos da linhagem de glioblastoma U87MG à infecção pelo *T. cruzi*, através da análise das taxas de infecção. Além disso, avaliamos a produção de mediadores inflamatórios e consumo do fator de necrose tumoral (TNF) em cultivos de astrócitos infectados, por citometria utilizando CBA. Utilizamos cultivos de astrócitos da linhagem U87MG infectados com tripomastigotas da cepa Colombiana do *T. cruzi*, na presença ou não de TNF. Os astrócitos U87MG foram suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* e as taxas de infecção sofreram influência da relação parasito-célula hospedeira inicial (MOI). A infecção induziu níveis elevados de interleucina-6 (IL-6) de modo relacionado ao número de parasitos albergados pelos astrócitos. Além disso, a infecção pelo *T. cruzi* aumentou o consumo de TNF, sugerindo aumento de expressão de receptores de TNF. Nossos dados sugerem que a infecção de astrócitos pelo *T. cruzi* induz ambiente inflamatório no SNC, com participação de citocinas em um processo que possivelmente se retroalimenta.

Apoio: CNPq, FAPERJ.

Biologia celular e interação parasito/célula hospedeira

Resumo 102

A autofagia durante a interação *Trypanosoma cruzi* e célula-hospedeira: papel do estresse nutricional no declínio da infecção

Thabata Lopes Alberto Duque^{1,2}, Otacílio C. Moreira³, Patrícia Torres Bozza⁴, Rossana C. N. Melo⁵, Andrea Henriques-Pons², Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto¹

1 Laboratório de Biologia Celular 2 Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos, 3 Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, 4 Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil 5 Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

O sucesso da infecção do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, depende da internalização do parasito e conseqüente fusão do vacúolo parasitóforo com o lisossomo, organela chave nos processos de endocitose e autofagia. A autofagia consiste no processo de degradação de macromoléculas e estruturas celulares, assim como de patógenos, participando assim de infecções intracelulares. No entanto, a participação da autofagia na infecção ainda não está claramente estabelecida. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a atuação da autofagia durante a infecção de células de cultura primária (macrófagos e cardiomiócitos) pelo *T. cruzi* (cepa Y). Primeiramente, as células infectadas mostraram um aumento de vesículas LC3+, comum marcador de autofagossomos, confirmando a infecção como um indutor de autofagia. A indução prévia de autofagia, realizada com meio depletado de glicose (estresse nutricional), levou em macrófagos a redução na infecção desde tempos iniciais (6h), enquanto que em cardiomiócitos apenas reduziram o número de células infectadas em tempos tardios (48h). Contudo, quando a autofagia foi induzida após a infecção, apenas em cardiomiócitos foi observado uma redução na infecção e no percentual de parasitos por célula infectada. O aumento de autofagia foi corroborado com o aumento da marcação de LC3 por microscopia de fluorescência e por análises ultraestruturais, que indicaram perfis de membrana concêntrica e diversos autofagossomos. A presença de corpúsculos lipídicos, via também integrada ao estresse nutricional, foi reduzida em macrófagos infectados e com indução de autofagia, quantidade bastante inferior ao observado em cardiomiócitos. Os resultados sugerem que a autofagia na infecção atua em distintos momentos de infecção. em fagócitos profissionais, a autofagia interfere na internalização e em fagócitos não profissionais há uma redução na proliferação intracelular e/ou eliminação do parasito. Desse modo, a autofagia, independente do mecanismo, reduz a infecção por *T. cruzi*.

Auxílio Financeiro: FAPERJ, CNPq e FIOCRUZ.

Biologia celular e interação parasito/célula hospedeira

Resumo 136

Efeito da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e da inflamação sobre a ativação de miofibroblastos cardíacos *in vitro*

Laura Lacerda Coelho^{1,2}; Líndice Mitie Nisimura¹; Daniel Adesse³; Mirian Claudia de Souza Pereira⁴; Joseli Lannes-Vieira²; Luciana Ribeiro Garzoni¹

¹Laboratório de Investigação Cardiovascular, ²Laboratório de Biologia das Interações, ³Laboratório de Biologia Estrutural, ⁴Laboratório de Ultra-estrutura Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

As alterações cardíacas causadas pela infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) incluem o remodelamento tecidual, caracterizado entre outros aspectos pela intensa fibrose que apresenta importante papel na disfunção do coração durante a cardiomiopatia chagásica (CC). Apesar do reconhecido envolvimento de fibroblastos na gênese da fibrose em diversos tecidos em diferentes doenças, o envolvimento dos fibroblastos cardíacos (FC) no desenvolvimento da fibrose durante a CC é ainda desconhecido, o que nos motivou a investigar o papel do parasita e da inflamação sobre estas células. Nesse contexto o objetivo do presente estudo é investigar o efeito da infecção pelo *T. cruzi* (cepa Y) e da inflamação sobre a ativação de miofibroblastos cardíacos obtidos a partir de culturas primárias de células cardíacas de fetos de camundongos, através de uma cinética de 6 a 72 horas de interação. Para verificarmos a ativação dos FC estamos analisando a proliferação, a diferenciação destas células em miofibroblastos e a expressão de matriz extracelular (ECM) através de imunofluorescência e Western blot (WB). No nosso sistema de cultura, 30% dos FC foram infectados pelo *T. cruzi* quando utilizamos uma relação de 10 parasitas por célula hospedeira. Nossos resultados demonstram até o presente momento que o *T. cruzi* não é capaz de induzir proliferação do FC, como avaliado pela marcação de ki67. No entanto, as análises da expressão de alfa actina de músculo liso (-SMA) por WB, revelaram aumento desta proteína nas culturas infectadas sugerindo diferenciação para miofibroblasto nos tempos de 6hpi, 24hpi e 48hpi. As análises de proteínas de matriz extracelular revelaram aumento na expressão de fibronectina 6hpi, 24hpi e 48hpi e de laminina 6hpi, quando comparadas as culturas controles não infectadas. Assim, nossos resultados obtidos até o momento, demonstram um efeito da infecção pelo *T. cruzi* sobre a ativação dos FC contribuindo para sua diferenciação e produção e componentes da ECM. Temos como perspectivas o desafio da hipótese que componentes da inflamação contribuem para a ativação de FC e a geração da fibrose cardíaca, o que testaremos através do uso das citocinas fator de crescimento transformante (TGF), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon (IFN) , propostos participarem da fisiopatogenia da CCC.

Apoio financeiro: CNPq, FAPERJ

Biologia celular e interação parasito/célula hospedeira

Resumo 139

Atividade *in vitro* e *in vivo* de viniconazole sobre *Trypanosoma cruzi*

Cristiane França da Silva¹, Denise da Gama Jaen Batista¹, Marcos Meuser Batista¹, Reto Brun² e Maria de Nazaré Correia Soeiro^{1*}

¹Laboratório de Biologia Celular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

²Department of Medical Parasitology and Infection Biology, Swiss Tropical and Public Health Institute, Basel, Switzerland.

A doença de Chagas é causada pelo protozoário parasita intracelular *Trypanosoma cruzi* e afeta mais de 10 milhões de portadores em áreas pobres da América Latina. Há uma necessidade urgente de medicamentos alternativos com melhor segurança, eficácia mais ampla, menores custos e menor tempo de administração. Assim, presentemente nosso objetivo foi avaliar a ação biológica e alvos celulares de um novo imidazole, o viniconazole, utilizando abordagens *in vitro* e *in vivo*. Os nossos resultados demonstram que, embora este composto tenha revelado moderada atividade sobre formas sanguíneas e intracelulares (16 e 24 μ M, respectivamente) *in vitro*, não foi capaz de controlar o parasitismo nem de proteger contra mortalidade induzida pela infecção *in vivo* (cepa Y). Dados ultra-estruturais demonstram que os danos celulares mais freqüentes foram associadas a elementos de membrana plasmática (%lebs+ além de ruptura da unidade e extravasamento de conteúdo intracelular), Golgi (inchaço) e o aparecimento de um grande número de vacúolos, e organelas circundadas por perfils de retículo endoplasmático, sugerindo um processo autofágico. Devido à necessidade urgente de novos agentes contra antiparasitários, o rastreio de produtos naturais e sintéticos deve ser reforçada com o objectivo de encontrar drogas mais seletivas e acessíveis para a doença de Chagas. Apoio: PDTIS/Fiocruz, CNPq,

Apoio Financeiro: FAPERJ, CAPES e Fiocruz

Biologia celular e interação parasito/célula hospedeira

Resumo 145

Posaconazol reverte a fibrose em culturas tridimensionais de células cardíacas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*

Líndice Mitie Nisimura¹; Laura Lacerda Coelho^{1,2}; Patrícia Mello Ferrão^{1,3}; Mariana Waghabi³; Mirian Claudia de Souza Pereira⁴; Luciana Ribeiro Garzoni¹

¹Laboratório de Investigação Cardiovascular, ²Laboratório de Biologia das Interações, ³Laboratório Genômica Funcional e Bioinformática, ⁴Laboratório de Ultra-estrutura Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

A doença de Chagas (DC) é endêmica na América Latina e causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). A cardiomiopatia é a principal manifestação da patologia e é caracterizada por presença de infiltrados inflamatórios, miocitólise e mionecrose e progressiva deposição de tecido fibrótico. A ineficácia das drogas disponíveis atualmente estimula a busca por novos compostos mais eficazes e menos tóxicos. Neste contexto, o posaconazol, um inibidor da biossíntese de ergosterol, que apresenta efeito antifúngico e potente atividade tripanocida tem sido avaliado como um possível tratamento para DC. No presente estudo, o nosso objetivo foi avaliar o efeito do posaconazol em culturas tridimensionais (3D) de células cardíacas infectadas pelo *T. cruzi* que mimetizam os aspectos da cardiomiopatia chagásica *in vivo*, incluindo fibrose e hipertrofia. As culturas 3D foram infectadas por formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 5 nM de posaconazol após 144 horas de infecção. Avaliamos a expressão de proteínas da matriz extracelular (ECM) e do inibidor tecidual de metaloprotease -4 (TIMP-4) western blot e imunofluorescência, além da secreção de fator de crescimento transformante beta (TGF-) por ELISA. Após 96 horas de tratamento, o posaconazol foi capaz de aumentar a secreção de TGF- no sobrenadante das culturas e reduzir a expressão de TIMP-4, fibronectina e laminina aumentados em culturas infectadas. Em conclusão, posaconazol apresentou um potente efeito antifibrótico em culturas de 3D células cardíacas demonstrando um efeito direto sobre a reversão da fibrose *in vitro*. Finalmente, acreditamos que este sistema de cultura 3D pode ser utilizado como uma poderosa ferramenta para avaliar novos compostos *in vitro* para o tratamento de fibrose cardíaca na DC.

Apoio financeiro: CNPq, FIOCRUZ/IOC, FAPERJ

Diagnóstico

Resumo 030

Padronização da técnica de PCR com alvos para região 5'UTR de Trans-sialidases de *Trypanosoma cruzi*

Pedro PLF de Albuquerque¹; Myllena F A D Melo¹; Adeilton Brandão²; Constança Britto¹

¹Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas; ²Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas. Instituto Oswaldo Cruz - IOC/Fiocruz - RJ

Para o diagnóstico molecular da doença de Chagas (DC), são utilizados alvos para o kDNA e para a região satélite nuclear do *Trypanosoma cruzi*, porém estes marcadores não possibilitam a caracterização da cepa infectante no paciente. Tem sido sugerido que as variações clínicas observadas na DC crônica estariam associadas a heterogeneidade observada entre as distintas cepas do parasito. Uma perspectiva para o aprimoramento do diagnóstico etiológico da DC seria a possibilidade de detecção e tipagem do *T. cruzi* diretamente de amostras clínicas utilizando um único marcador. Observou-se que a região 5'UTR (5q Untranslated Region) dos genes da família de trans-sialidase (TS) apresenta variações distintas entre os grupos populacionais de *T. cruzi* e poderia representar um bom marcador para a caracterização das linhagens do parasito. Adicionalmente, por serem genes multi-cópias, poderiam conferir alta sensibilidade, mesmo em amostras de pacientes com DC crônica. Assim, o presente trabalho visa padronizar a PCR com os alvos 5'UTR de TS para posterior aplicação na tipagem molecular em amostras clínicas. Para determinar o limite de detecção da PCR, seis curvas padrão foram geradas com as cepas Dm28c (DTUI), Y (DTUII), 3663 (DTUIII), 4167 (DTUIV), Bug (DTUV) e CL Brener (DTUVI), por diluições seriadas contendo 10⁴ a 0.5 equivalentes de parasitos/mL. Utilizando o alvo 5'UTR_{TS}, foi possível detectar até 0.5 parasitos/mL em todas as cepas testadas, comparando com o alvo kDNA, onde houve variação no limite de detecção entre 10 e 0.5 parasitos/mL. A fim de avaliar o desempenho da técnica foram analisadas amostras de sangue de 10 pacientes com DC crônica. Após a amplificação da região 5'UTR de TS, os produtos foram clonados com o kit TOPO 10 e sequenciados pelo método de Sanger. As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com os dados do GenBank (NCBI), havendo identidade de mais de 90% com genes de TS de *T. cruzi*. Os resultados desta padronização sugerem que a PCR desenvolvida é capaz de detectar a região 5'UTR de TS em amostras de pacientes com baixa parasitemia. Como perspectivas, a análise da técnica com amostras de pacientes crônicos e indivíduos não infectados serão ampliadas, com a finalidade de testar a sensibilidade e especificidade da técnica. Em paralelo, o método de qPCR utilizando a abordagem High Resolution Melting (HRM) será empregado para o aperfeiçoamento da tipagem molecular com o alvo 5'UTR_{TS} de *T. cruzi*.

Auxílios: Cnpq; FAPERJ; Fiocruz

Diagnóstico

Resumo 037 (Apresentação Oral)

Desenvolvimento de um protótipo de kit para o diagnóstico molecular e avaliação da carga parasitária em pacientes com Doença de Chagas

Leticia Souza; Maria Angélica Cardoso; Otacílio Moreira; Constança Britto.

Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE), IOC-FIOCRUZ

Financiadores: CNPq e PDTIS.

A Doença de Chagas apresenta uma prevalência de 6 a 8 milhões de indivíduos afetados, dos quais 30-40% desenvolvem cardiomiopatia, mega síndromes digestivas ou ambos. Diversos casos já foram registrados em países não endêmicos, onde a infecção ocorre através de mecanismos de transmissão não vetoriais, como transmissão congênita, transplantes de órgãos, transfusão de sangue ou oral. Os atuais tratamentos, utilizando os quimioterápicos nifurtimox e benzonidazol, não são ideais, pois sua eficácia é comprovada apenas na fase aguda da doença, além de possuírem diversos efeitos colaterais. A sorologia é o padrão ouro no diagnóstico da doença de Chagas. Entretanto, a técnica da PCR é uma eficiente ferramenta complementar ao diagnóstico nos casos de transmissão congênita, em resultados discordantes na sorologia e na avaliação do tratamento etiológico. Além disso, a PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) possui alto potencial para ser utilizada no acompanhamento dos pacientes sob tratamento, como marcador de cura etiológica. Assim, este trabalho tem como objetivo desenvolver um teste de diagnóstico molecular baseado em PCR em Tempo Real, utilizando insumos produzidos pela Fiocruz/Paraná (IBMP), para a quantificação dos níveis absolutos de *Trypanosoma cruzi* em amostras sanguíneas de indivíduos infectados, e aplicação no monitoramento da eficácia terapêutica e controle de cura da doença de Chagas. Para isso, realizamos a padronização da qPCR, definindo as melhores concentrações dos reagentes no master mix Fiocruz (MgCl₂ 8mM, dNTP 300µM, e ROX 30nM). Também avaliamos a extensão dinâmica da reação, observando uma linearidade de amplificação entre 10⁴ a 0,5 equivalentes de parasito/mL. Os ensaios para o cálculo do Limite de Detecção (LOD) indicaram um LOD de 0,40 eq. parasitos/mL, que foi estatisticamente semelhante ao observado na reação utilizando insumos comerciais. Em um teste com amostras de sangue de 50 pacientes portadores da doença de Chagas crônica, pertencentes ao estudo BENEFIT, e 20 pacientes com sorologia negativa, encontramos 100% de sensibilidade e especificidade na reação com os insumos Fiocruz, em contraste com 95% de sensibilidade e 100% de especificidade na reação com os insumos comerciais. Até o momento, nossos resultados mostram-se bastante promissores para a elaboração de um protótipo de kit para o diagnóstico molecular acurado de pacientes com suspeita de doença de Chagas, a ser aplicado no ambiente do Sistema Único de Saúde brasileiro.

Diagnóstico

Resumo 038

Desenvolvimento de uma metodologia baseada em PCR em Tempo Real para a quantificação de *Trypanosoma cruzi* em amostras de insetos triatomíneos

Paula Finamore Araujo; Constança Felícia De Paoli de Carvalho Britto; Otacilio da Cruz Moreira

Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas . Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ- Rio de Janeiro . Brasil

A doença de Chagas constitui a quarta mais importante doença tropical, suplantada somente pela malária, tuberculose e esquistossomose. Embora o principal vetor da doença, *Triatoma infestans*, tenha sido erradicado no Brasil, as crescentes alterações induzidas pelo devastamento das florestas e crescimento das cidades aumentam o potencial de outras espécies de triatomíneos na transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Sendo assim, a determinação da taxa de infecção pelo protozoário nos vetores triatomíneos coletados em regiões do Brasil com diferentes índices de endemicidade é relevante para o melhor conhecimento acerca da epidemiologia da doença de Chagas, assim como na elaboração de programas de controle da disseminação desta doença. O método clássico para descrição de infecção natural de triatomíneos por *T. cruzi* . o exame microscópico . apresenta limitações como: baixa sensibilidade e reprodutibilidade, dificuldade de exame nos diferentes estágios evolutivos dos vetores, necessidade da análise em insetos frescos, além de ser um procedimento extremamente laborioso. Nesse contexto, a utilização da PCR em Tempo Real (qPCR) no diagnóstico de *T. cruzi* apresenta várias vantagens, como maior sensibilidade, rapidez e reprodutibilidade, além de possibilitar o desenvolvimento de protocolos para quantificar patógenos nas mais variadas amostras, como sangue, tecidos e fezes, tornando viável a elaboração de uma metodologia para avaliar a carga parasitária em triatomíneos infectados com *T. cruzi*. A presente proposta tem como principal objetivo desenvolver uma metodologia baseada em qPCR que seja capaz de quantificar os níveis absolutos de *T. cruzi* e diferenciar formas tripomastigotas de epimastigotas em amostras de insetos infectados. Para estimar a carga parasitária em amostras de insetos positivas para infecção por *T. cruzi*, padronizamos um ensaio de PCR em Tempo Real pelo sistema TaqMan em *multiplex* com alvos para o gene correspondente à região 12S do RNA ribossomal de triatomíneos e para o DNA nuclear satélite de *T. cruzi*, realizada por quantificação absoluta. Até o momento, foi possível obter uma detecção linear de *T. cruzi* na faixa de 10^5 a 0,5 equivalentes de parasito/ mL e determinar um Limite de Detecção em 0,41 eq. Parasitas/mL. Atualmente estamos padronizando uma reação de RT-qPCR capaz de quantificar diferencialmente as formas do parasito, em amostras de triatomíneos, com alvos nos genes correspondentes à proteína trans-sialidase, altamente expressos na forma tripomastigota metacíclica. A quantificação da carga parasitária no inseto, juntamente com a avaliação da metaciclogênese, irão contribuir em estudos relacionados à competência vetorial dos triatomíneos, permitindo descrever uma possível associação com a incidência da doença de Chagas.

Financiadores: CNPq; IOC; FAPERJ

Diagnóstico

Resumo 116

UMA NOVA PROTEÍNA QUIMERA PARA O USO EM TESTE DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO PELO *T. CRUZI*

Andressa da Matta Durans^{1,2}, Flavia Coelho Garcia dos Reis^{2,3}, David William Provance, Jr^{2,3}, Angela Cristina Verissimo Junqueira¹

1. Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz;
2. Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz;
3. Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Presidência - Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

A doença de Chagas está entre as 17 doenças negligenciadas e é uma antropozoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. O sucesso no tratamento para infecções de *T. cruzi* está diretamente relacionado ao diagnóstico precoce durante a fase aguda, quando a produção de anticorpos é baixa no paciente. Por essa razão, os testes atuais se baseiam na identificação do parasita no sangue, mas essa exige disponibilidade de infra-estrutura, o que não é viável em áreas endêmicas. Enquanto, testes sorológicos convencionais mostram alta sensibilidade, mas sofrem com especificidade baixa, devido a alguns determinantes antigênicos, por apresentarem reatividade cruzada com outros patógenos. O emprego de proteínas recombinantes apresenta elevada especificidade, mas os testes comerciais atuais, baseados em proteínas recombinantes apresentam um número limitado de proteínas recombinantes para administrar o custo-benefício, isso restringe o número de epítopos incluídos no teste. Para superar essa restrição, esse projeto visa desenvolver uma proteína recombinante contendo múltiplos epítopos que aumenta a sensibilidade, diminuir custos e pode ser aplicado no campo. Dez epítopos foram selecionados, dentro de antígenos descritos na literatura, por análise bioinformática e SPOT- *synthesis analysis*. As sequências de DNA que os codificam, foram incluídas na sequência codificadora de uma proteína específica que pode aceitar as sequências desconhecidas sem comprometer sua capacidade para formar uma estrutura estável em solução. Uma proteína quimérica, com os primeiros oito primeiros epítopos, expressou parcialmente solúvel. As próximas etapas serão incluir outros dois epítopos e testar reatividade de anticorpos em soro de pacientes. Esta proteína quimera deverá possibilitar o desenvolvimento de um teste rápido de simplificada execução em campo; estável a temperatura ambiente; baixo custo; alta sensibilidade e especificidade com relação aos testes comercializados.

Auxílio: CAPES, IOC, CNPq.

Educação/informação

Resumo 029

Novas ferramentas visando a identificação dos triatomíneos

José Jurberg, Juliana M. S. Rodrigues, Felipe F. F. Moreira, Carolina Dale, Isabelle R. S. Cordeiro, Valdir D. Lamas Jr, Cleber Galvão & Dayse S. Rocha

Cento e seis anos nos separam da descoberta da doença de Chagas, doença transmitida por um vetor artropodo e por outros meios hoje sobejamente conhecidos. Até o presente não existe meios de cura na fase crônica através de fármacos, não existe vacina, não houve substituição das casas de pau-à-pique cobertas com folhas de palmeiras. O controle dos vetores através de inseticidas, bem como o controle do sangue doado, tem sido as principais armas contra a doença.

O LNIRTT começou em 2009 um projeto de educação através da distribuição de coleções de estampas coloridas (cinco blocos, um para cada região geográfica do Brasil) retratando todas as espécies conhecidas. O material é resistente a impactos, água, manuseio constante e visa dotar os agentes de saúde, professores, pesquisadores e interessados em identificar os Triatomíneos e conscientizar a população em geral sobre a existência da doença nas áreas afetadas. Recentemente editamos um Atlas Iconográfico dos Triatomíneos do Brasil, o material tem sido distribuído para os centros de saúde e agora começou a ser distribuído na área de ensino de 1º e 2º grau, para que as crianças se conscientizem dos perigos de serem infectadas.

Financiadores: Ministério da Saúde, Fiocruz, CNPq e Faperj.

Educação/informação

Resumo 036

Elaboração de material didático para identificação laboratorial do *Trypanosoma cruzi* para diagnóstico de fase aguda da doença de Chagas

Rejane Seila da Silva Castro e Juliana de Meis

Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ/ RJ

O número de notificações de doença de Chagas aguda (DCA) vem aumentando no Brasil, principalmente na região da Amazônia Legal. Desde a implantação do Programa de Doença de Chagas em 2006, foram registrados 931 casos confirmados (até 2013) da doença em 56 municípios no Pará. Segundo o Ministério da Saúde, a maior parte desse aumento no número de casos de DCA no país ocorre por transmissão oral, preocupando as autoridades. A secretaria de Saúde do Pará está promovendo várias campanhas, como treinamento de técnicos em saúde, cursos de capacitação em boas práticas de manipulação e processamento do açaí, entre outros. O diagnóstico precoce da infecção é fundamental para o sucesso do tratamento. Segundo as estimativas do Laboratório Central do Estado do Pará, menos de um terço dos microscopistas responsáveis pelo diagnóstico de doenças parasitárias hoje são capazes de identificar o *T. cruzi* no sangue de pacientes e fechar o diagnóstico de Chagas agudo por exame direto. Nesse projeto, pretendemos confeccionar e difundir material didático para aumentar o conhecimento e promover a capacitação de profissionais da área de saúde para o diagnóstico da DCA. Nesse sentido, desenvolveremos manuais, filipetas, cartilhas e vídeos de fácil compreensão que facilitem aos profissionais da região Amazônica a identificação do *Trypanosoma cruzi*, de suas vias de transmissão e dos sintomas de fase aguda da Doença de Chagas após um processo de infecção por via oral ou clássica (vetorial-picada). A elaboração do material didático contará com um levantamento preliminar das principais dificuldades enfrentadas nas rotinas de diagnóstico dessa doença em Laboratórios e Unidades de Saúde do Estado do Pará. Posteriormente, validaremos, em abrangência nacional, o material preparado, através de um questionário simplificado que será entregue aos profissionais da área da saúde. Esse questionário abordará a qualidade e a clareza das informações oferecidas no material didático.

Financiadora: Faperj

Educação/informação

Resumo 103

Doença de Chagas e novos desafios na transmissão oral pelo consumo de açaí

Renata Trotta Barroso Ferreira, Maria Regina Branquinho, Paola Cardarelli Leite.

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) / FIOCRUZ. Rio de Janeiro, Brasil.

Até o ano de 2004, a ocorrência de doença de Chagas aguda (DCA) por transmissão oral, relacionada ao consumo de alimentos, constituía um evento pouco conhecido ou investigado. Atualmente apresenta altos índices entre populações de áreas endêmicas (Cone Sul: Brasil e Argentina) e países do norte da América do Sul (norte do Brasil, Bolívia, Colômbia e Venezuela), com grande importância pela sua frequência, dificuldade de controle, falta de reconhecimento e necessidade de novas estratégias de prevenção. A transmissão pela via oral ocorre principalmente por ingestão de alimento contaminado com triatomíneos infectados ou suas fezes, ingestão de carne crua ou mal cozida, ou ainda pelas secreções de alguns mamíferos infectados.

Os casos recentes notificados no Brasil de DCA estão relacionados ao consumo de açaí, considerado um alimento essencial na dieta da população da Região Norte e muito apreciado nos demais estados brasileiros e em outros países.

No Brasil, dentro e fora da região amazônica, muitos casos de DCA têm sido registrados em forma de surto caracterizando-se por um grupo de pessoas reunidas em um mesmo lugar que ao ingerirem um mesmo tipo de alimento adoecem quase que simultaneamente com quadro febril e manifestações gerais de uma infecção sistêmica. No período de 1965 até 2009 foram registrados 8 surtos fora da região amazônica brasileira, totalizando 106 casos com 15 óbitos. Na região amazônica brasileira foram 149 surtos distribuídos pelos estados do Acre (3), Amapá (22), Amazonas (2), Maranhão (2) e Pará (120), totalizando 423 casos descritos entre os anos de 1968 a 2010.

Apesar de existirem importantes estratégias sendo implementadas pelo Brasil no combate à doença de Chagas transmitida via alimento, ainda há a necessidade de incentivos à pesquisa para que conhecimentos gerados auxiliem na compreensão da transmissão oral e sua melhor interpretação epidemiológica, de prevenção e controle. A implementação das Boas Práticas de Higiene, Boas Práticas de Manufatura e a aproximação entre instituições de ciência e os produtores de açaí também poderão contribuir na solução deste problema.

Sendo assim, existem muitos desafios para o Brasil no que se refere à estruturação de ações voltadas para atenção, vigilância, prevenção e controle, com vistas a respostas efetivas para toda a sociedade.

Desta forma, espera-se que os produtores de polpa alcancem um estágio de produção que garanta a qualidade, a minimização dos riscos de saúde, o valor nutricional e as propriedades sensoriais desse alimento tão desejado na cultura local.

Epidemiologia

Resumo 129

Comportamento alimentar e de defecação de *Triatoma brasiliensis brasiliensis*, *Triatoma juazeirensis* e seus híbridos experimentais, sob condições de laboratório

Nathália Cordeiro Correia¹, Carlos José de Carvalho Moreira², Teresa Cristina Monte Gonçalves³, Jane Costa¹

1 - Laboratório de Biodiversidade Entomológica, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. 2 - Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. 3 - Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Triatoma b. brasiliensis, considerado um dos principais vetores da doença de Chagas nas áreas do semiárido nordestino brasileiro, faz parte de um complexo de espécies proposto através de estudos multidisciplinares com base na geografia, morfologia, biologia, ecologia e análises moleculares. Atualmente neste complexo estão incluídos também *T. b. macromelasoma* e *T. juazeirensis*, apresentando um padrão de distribuição parapátrico nos estados de Pernambuco e Bahia, respectivamente. Todas as espécies do complexo *T. brasiliensis* foram encontradas infectadas naturalmente por *T. cruzi* e podem invadir ou colonizar as habitações humanas demonstrando diferentes graus de adaptação aos ecótopos artificiais. Em laboratório, foram obtidos híbridos férteis entre todas as combinações possíveis nesse grupo de insetos. Assim, a hipótese de existirem híbridos naturais foi testada através de estudos morfométricos comparativos das asas e também do padrão cromático do pronoto. Os resultados sugeriram a existência de uma área de hibridação natural no estado de Pernambuco onde posteriormente uma alta variabilidade fenotípica foi registrada corroborando a hipótese levantada. Pernambuco apresenta altos índices de infestação domiciliar por triatomíneos que também podem ser encontrados em ecótopos naturais, portanto, os riscos de transmissão do agente etiológico e as possibilidades de reinfestação das casas demandam um constante monitoramento e controle dos vetores nas áreas habitadas. Este trabalho objetiva analisar um dos parâmetros relacionados à competência vetorial de *T. b. brasiliensis*, *T. juazeirensis* e de seus híbridos experimentais, obtidos através de cruzamentos recíprocos entre as espécies. Os comportamentos alimentar e de defecação foram analisados comparativamente através do registro do tempo de início do repasto sanguíneo em camundongos, tempo de duração da alimentação, tempo do término da alimentação e tempo e comportamento de defecação de ninfas de 5º estágio. Os insetos foram pesados antes e após a alimentação. Híbridos e parentais apresentaram voracidade alimentar, pois procuraram avidamente a fonte alimentar nas primeiras semanas de alimentação. Foi observado que após a segunda semana, os híbridos levaram mais tempo para iniciarem o repasto sanguíneo e ainda na primeira semana levaram mais tempo para defecar após a alimentação quando comparados aos parentais. *T. b. brasiliensis*, apresentou as menores médias de tempo para se aproximar da fonte alimentar e iniciar a alimentação, porém não foi estatisticamente diferente de *T. juazeirensis*. Todos os grupos estudados apresentaram íntima relação com a fonte alimentar, defecando próximo ou diretamente no camundongo. Foi evidenciada diferença significativa de peso adquirido entre as espécies na primeira semana, Hjb (*T. b. brasiliensis* x *T. juazeirensis*) e *T. b. brasiliensis* apresentaram menores médias de ingestão de sangue do que Hbj (*T. juazeirensis* x *T. b. brasiliensis*) e *T. juazeirensis*.

Epidemiologia

Resumo 141

Fatores associados ao risco para a doença de Chagas em áreas rurais endêmicas do município de Russas, Ceará: Indicadores entomológicos e ambientais

Antonia de Castro Ribeiro¹, Taís Ferreira Gomes¹, Layla C. V. Nunes¹, Márcia X. Gumiel Rocha², Peter Waniek², Patrícia de Azambuja², Marli Maria Lima¹

¹Laboratório de Ecoepidemiologia de Doença de Chagas, ²Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, RJ, Brasil, CEP: 21045-900

A região do nordeste brasileiro apresenta grande relevância no panorama da doença de Chagas, por ser centro de dispersão de algumas espécies nativas de triatomíneos como *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma pseudomaculata*. Com intuito de investigar a infestação pelos vetores da endemia chagásica, a circulação de *Trypanosoma cruzi* e fornecer subsídios para o controle, foram selecionadas localidades rurais do município de Russas-CE como área de estudo. Objetivou-se analisar a fauna de triatomíneos e investigar os fatores associados ao risco de infestação por esses insetos e de transmissão da doença de Chagas em diferentes localidades rurais do município, através de técnica de biologia molecular e de geoprocessamento. A busca por triatomíneos foi realizada em novembro e dezembro de 2013, no intra e peridomicílio de 193 unidades domiciliares das localidades rurais de Bonhu, Capim Grosso, Patos do Tito, Riacho do Barro, Sítio Maxixe e Timbaúba do Pitingão. Foram capturados 374 triatomíneos, sendo *T. brasiliensis* a espécie mais abundante (86,63%), seguida por *T. pseudomaculata* (10,70%) e *Rhodnius nasutus* (2,67%). Para a determinação do índice de infecção natural por *T. cruzi*, todos os exemplares coletados foram submetidos ao exame direto, obtendo 0% de positividade. A técnica de PCR Multiplex permitiu a caracterização molecular dos genes de kDNA e de minixon de 129 exemplares pertencentes ao 5º estágio e adultos, obtendo 10,85% de positividade para kDNA e 4,65% de positividade para *T. cruzi* I. Os indicadores entomológicos calculados mostraram que Sítio Maxixe e Patos do Tito apresentaram altos índices de infestação e colonização domiciliar; a densidade triatomínica domiciliar foi maior em Patos do Tito e em Riacho do Barro. Capim Grosso apresentou níveis baixos nos três indicadores entomológicos. Com relação a Bonhu e Timbaúba do Pitingão os indicadores foram nulos. Os mesmos indicadores mais o índice de dispersão foram calculados para cada espécie de triatomíneo capturada. *T. brasiliensis* apresentou maiores índices de densidade e de colonização enquanto *T. pseudomaculata* apresentou os maiores índices de infestação e dispersão; *R. nasutus* obteve os índices mais baixos. A análise dos fatores relacionados à infestação por triatomíneos indicou que a presença de outros tipos de anexos como casas de taipa abandonadas, utilizadas como abrigo de animais ou depósito de materiais, e distâncias menores que um metro aumentam o risco de infestações por triatomíneos. Os resultados deste estudo podem colaborar para a melhor compreensão da epidemiologia da doença de Chagas e também para elaboração de medidas de controle específicas para cada localidade.

Apoio: CAPES, IOC, FIOCRUZ

Epidemiologia

Resumo 144

Estudo das características epidemiológicas de localidades rurais do município de Russas/Ceará-Brasil para presença de triatomíneos

Taís Ferreira Gomes¹, Antonia de Castro Ribeiro¹, Layla Caroline Nunes¹, Filipe Anibal Carvalho-Costa² e Marli Maria Lima¹.

¹Laboratório de Ecoepidemiologia da Doença de Chagas, ²Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular . Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz - Rio de Janeiro/Brasil

Introdução: Nos estados do nordeste do Brasil, a doença de Chagas ainda hoje é endêmica. Nessas regiões, as populações humanas susceptíveis são geralmente formadas por pessoas que vivem em extrema pobreza, em áreas onde proliferam triatomíneos nativos e habitações humanas que propiciam a colonização desses vetores da doença. **Objetivo:** Este trabalho se propõe a estudar a relação entre o ambiente construído e a presença de triatomíneos em áreas endêmicas da região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Metodologia:** Foram investigadas cinco localidades rurais do município de Russas (Patos do Tito, Sítio Maxixe, Riacho do Barro, Timbaúba do Pitingão e Bonhu), tendo como base questões sociodemográficas, através da aplicação de questionário e aspectos físico/construtivos das residências. No total, 163 famílias das localidades de abrangência do estudo participaram da pesquisa e foram realizadas buscas de triatomíneos nos respectivos domicílios e peridomicílios. **Resultados e Conclusões:** Foram capturados 365 espécimes de triatomíneos, com predomínio de *Triatoma brasiliensis* (324 espécimes), seguido de *Triatoma pseudomaculata* (32 espécimes) e *Rhodnius nasutus* (9 espécimes). Os triatomíneos foram predominantemente capturados nos peridomicílios; no intradomicílio, somente foram encontrados em uma residência de taipa abandonada, utilizada como galinheiro. No total, foram encontradas 163 residências, das quais 59,51% (97/163) eram de alvenaria com ou sem reboco, 34,97% (57/163) de taipa e 5,52% (9/163) mistas (tijolo e taipa). O número significativo de casas de taipa ainda hoje existentes nas localidades é decorrente não só de questões econômicas, mas também culturais. Foi observado também que as casas de taipa são construídas de maneira inadequada, os beirais são pequenos ou inexistentes, possibilitando a infiltração nas paredes e o reboco, quando existente, torna-se vulnerável às intempéries. Quanto às casas de alvenaria, geralmente as construções são realizadas sem elemento estrutural, favorecendo não somente a instabilidade e fragilidade das paredes das residências, mas também a percepção comumente revelada por 61% dos moradores de que uma casa de pau-a-pique, ainda que não construída de maneira adequada, é bem mais segura (em relação à estabilidade da construção). A falta de oferta de habitação alternativa de maior qualidade e estabilidade, bem como de orientação adequada para construções mais seguras são as maiores responsáveis pela presença de casas de taipa nas localidades investigadas. Os tipos de construções das residências, as alterações do meio ambiente e a forte presença de triatomíneos nativos indicam que a região necessita de constante vigilância entomológica.

Apoio financeiro: FIOCRUZ/IOC; BSM; CNPq e CAPES.

Parasito (diversidade genética, molecular, biológica e morfológica)

Resumo 035

Padronização e validação da genotipagem de *Trypanosoma cruzi* em amostras de pacientes portadores da Doença de Chagas crônica no Brasil . associação com a carga parasitária

Ícaro Rodrigues-Santos¹, Myllena Melo¹, Pedro Brasil², Alejandro Hasslocher²,
Constança Britto¹, Otacílio Moreira¹

¹Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE), Instituto
Oswaldo Cruz/RJ

²Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) ó FIOCRUZ/RJ

A doença de Chagas é um importante problema de saúde pública em muitos países latino-americanos. Atualmente, estima-se que a 7-8 milhões de pessoas estão infectadas e 75-90 milhões estejam expostos à doença. *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença, é representado por um conjunto de cepas ou isolados que circulam em hospedeiros mamíferos e insetos vetores, com grande heterogeneidade de comportamento biológico e diferentes níveis de virulência em humanos e em modelos animais, além de diferentes níveis de sensibilidade às drogas e prognóstico da doença. Assim, um grande desafio atual seria identificar marcadores genéticos de *T. cruzi* capazes de dividir os isolados em grupos distintos e associá-los à patogênese da doença de Chagas. Neste trabalho, que é um estudo cego, foram selecionados 144 pacientes do Instituto Nacional de Doenças Infecciosas Evandro Chagas, 72 com sorologia positiva e 72 com sorologia negativa, de diferentes regiões do Brasil e apresentando manifestações clínicas distintas da doença. Para cada paciente, duas amostras de sangue foram coletadas antes do início do tratamento. Para estimar a parasitemia, o DNA foi extraído de amostras de sangue, utilizando o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). A carga parasitária foi estimada pelo ensaio qPCR TaqMan. Resumidamente, este ensaio multiplex compreende um alvo de DNA satélite nuclear de *T. cruzi* e um alvo do gene da RNase P humana, como um controle interno. A qPCR foi realizada para as 288 amostras, as quais 92 foram positivas para *T. cruzi*. A carga parasitária apresentou uma variação de 0,005±0,003 a 336,09±48,59 equivalentes de parasito/mL (p. eq./ mL), com um valor mediano de 2,030 p. eq./mL. Em paralelo, padronizamos a tipagem molecular de *T. cruzi* diretamente a partir de amostras sanguíneas de pacientes, com base nas metodologias de PCR multilocus descritas por Burgos *et al.* (2010) e Ramirez *et al.* (2010). Até o momento, nossos resultados indicam que cerca de 56% das amostras genotipadas foram TcII ou TcVI. Ao final do trabalho, ao se abrir o resultados do estudo, pretendemos investigar as possíveis correlações entre a carga parasitária, genótipo do parasito e progressão da doença de Chagas.

Financiadores: CAPES, FAPERJ, CNPq e IOC-Fiocruz

Parasito (diversidade genética, molecular, biológica e morfológica)

Resumo 040

High Resolution Melting e Multilocus Sequencing Typing como ferramentas para a tipagem molecular de *Trypanosoma cruzi*

Ronald Martins; Ícaro Rodrigues; Otacilio Moreira.

Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE), IOC-FIOCRUZ

A doença de Chagas é uma enfermidade endêmica ainda negligenciada, que constitui um grande problema para a saúde pública, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Os diferentes resultados que podem ser encontrados na manifestação clínica em pacientes humanos podem ser atribuídos à genética do hospedeiro e à heterogeneidade genética das populações do parasito. Com a disponibilização do genoma de *T. cruzi*, novas possibilidades foram geradas para a identificação de marcadores de genotipagem e diagnóstico molecular, a fim de diferenciar as subpopulações do parasito em grupos distintos (Unidades Discretas de Tipagem - DTU I a VI). Atualmente, as metodologias baseadas em PCR convencional e Tempo Real (qPCR) têm sido empregadas para realizar a tipagem molecular do parasito diretamente de amostras de pacientes, fornecendo informações para um maior entendimento da complexidade e dinâmica da sua diversidade, correlacionando DTUs, parasitemia e manifestações clínicas. Este trabalho consiste em avaliar o potencial do alvo kDNA, através da técnica de *High Resolution Melting* (HRM), assim como os alvos MetIII, RB19 e TcGPXII pela ferramenta *Multilocus Sequence Typing* (MLST), a fim de diferenciar as populações de *T. cruzi*. Inicialmente, realizamos ensaios de HRM com as cepas Colombiana (DTU I), Dm28c (DTU I), Y (DTU II), 3663 (DTU III), 4167 (DTU IV), Bug2149 (DTU V), CL (DTU VI) e Tulahuen (DTU VI), utilizando iniciadores direcionados às regiões conservada ou variável do kDNA. Na amplificação das regiões variáveis, observamos um agrupamento das amostras em 4 variantes distintas, enquanto nas regiões conservadas atentamos um agrupamento em 6 diferentes variantes. Para uma análise mais aprofundada da região conservada do kDNA, realizamos um alinhamento com 131 sequências de 19 cepas representantes de 4 DTUs (I, II, V e VI), provenientes do *GenBank* (NCBI). Foi possível observar uma região polimórfica de 11 pares de base, entre duas regiões altamente conservadas que demonstrou ter potencial para diferenciar subpopulações do parasito. Paralelamente, iniciamos a validação da técnica de MLST para genotipagem do parasito com os alvos MetIII, RB19 e TcGPXII e estas últimas apresentaram um padrão de bandas de 400, 350 e 450 pb. A análise individual do tamanho e sequência dos produtos de PCR comprovou a amplificação dos alvos desejados. Os resultados encontrados demonstram o potencial destas técnicas na genotipagem de *T. cruzi*. Diante disso, pretendemos padronizar e validar estas ferramentas em amostras clínicas de pacientes portadores da doença de Chagas crônica.

Financiador: FAPERJ.

Parasito (diversidade genética, molecular, biológica e morfológica)

Resumo 053 (Apresentação Oral)

Distribuição geográfica e diversidade de hospedeiros de *T. cruzi* DTUs TcIII e TcIV em diferentes biomas brasileiros

Barros JHS, Xavier SCC, Lima VS, Bilac D, Jansen AM

Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, IOC/Fiocruz

Financiadores: Faperj, CNPq, ChagasEpiNet, Coleção de Trypanosoma de Mamíferos Silvestres, Domésticos e Vetores (COLTRYP/IOC)

Trypanosoma cruzi é identificado atualmente em seis distintas DTUs (Discrete Typing Units), TcI a TcVI, cujos padrões de distribuição na natureza, hospedeiros/reservatórios e importância eco-epidemiológica ainda são pouco conhecidos. Assim, nosso objetivo foi demonstrar e contribuir com o conhecimento da distribuição geográfica e a diversidade de hospedeiros mamíferos e vetores das DTUs de *Trypanosoma cruzi* TcIII e TcIV na natureza. Foram determinadas as linhagens de isolados de *T. cruzi* provenientes dos biomas do Pantanal, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Amazônia depositados na COLTRYP/IOC. Inicialmente, foi realizada a PCR com alvos moleculares dirigidos para o gene do mini-exon. Posteriormente, as amostras identificadas com perfil Z3 ou TcI/Z3 foram analisadas por PCR-RFLP do fragmento de 650bp do gene histona 3, submetido à enzima de restrição AluI para determinação das DTUs. A DTU TcIV foi identificada em 32/42 isolados com infecções simples e mistas nos cinco biomas estudados. Dentre estes, 18 isolados foram provenientes de mamíferos e 14 de triatomíneos. Foi observado um largo espectro de hospedeiros mamíferos que incluiu sete espécies distribuídas em cinco ordens (Rodentia, Didelphimorphia, Artiodactyla, Chiroptera, Cingulata) e em exemplares de triatomíneos do gênero *Triatoma*. A DTU TcIII foi identificada em 10/42 isolados provenientes de quatro biomas: Pantanal, Caatinga, Mata Atlântica e Amazônia. Destes, oito isolados foram derivados de cinco espécies de mamíferos incluídos em três ordens (Cingulata, Carnivora, Didelphimorphia) e em dois exemplares de triatomíneos do gênero *Rhodnius*. Vale ressaltar, que até então as DTUs TcIII e TcIV tem sido descritas como quase exclusivamente em ciclos de transmissão mais restritos e focais na Amazônia e em associação com a ordem Cingulata. Entretanto, este estudo vem demonstrar que essas DTUs estão amplamente dispersas na natureza uma vez que foram encontradas em cinco dos seis biomas brasileiros, em seis das oito ordens de mamíferos que *T. cruzi* é capaz de infectar (Rodentia, Didelphimorphia, Artiodactyla, Carnivora, Cingulata, Chiroptera) e dois gêneros de triatomíneos (*Triatoma*, *Rhodnius*), importantes vetores de *T. cruzi*. Além disso, as DTUs TcIII e TcIV foram identificadas em mamíferos que frequentam diferentes microhabitats e áreas com perfis eco-epidemiológicos distintos. Essas múltiplas variáveis resultam em ciclos de transmissão de *T. cruzi* complexos que podem ou não se sobrepor mesmo em um único estrato florestal com características e particularidades locais e temporais. O estudo demonstra pela primeira vez que as DTUs TcIII e TcIV são mais amplamente distribuídas na natureza, contribuindo numa visão mais completa do padrão de dispersão dessas DTUs.

Parasito (diversidade genética, molecular, biológica e morfológica)

Resumo 123

Desenvolvimento e padronização de um PCR *multiplex* baseado em *Rolling Circle Amplification* (RCA) para a genotipagem de protozoários patogênicos

Elisa C Pereira¹, Diogo A Tschoeke², Luisa R Pitaluga³, Alberto M R Dávila¹

¹ Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas . IOC . FIOCRUZ

² Universidade Federal do Rio de Janeiro

³ Universidade Federal de Santa Catarina

Protozoários parasitas de importância médica e veterinária são responsáveis por causar doenças graves, e algumas delas são consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), sendo exemplos a Doença de Chagas, as tripanossomíases africanas, dentre outras. Essas doenças causam cerca de 1 bilhão de mortes por ano no mundo, e ainda assim são pouco estudadas apesar de seu grande impacto na saúde e, além disso, incluem-se os de importância veterinária que causam grandes prejuízos à indústria pecuária. Genes ortólogos conservados comuns aos protozoários podem ser usados como marcadores para genotipagem de protozoários parasitas, visando obter uma caracterização inter-específica. Com os avanços da genética molecular, técnicas como a genotipagem vem sendo cada vez mais utilizadas. Para que seja possível uma análise mais abrangente usando diferentes genes, uma abordagem *multilocus* (uso de múltiplos marcadores) se faz necessária. Para isso, utiliza-se a técnica de PCR *multiplex*, que é uma reação de amplificação desenhada para amplificar e detectar múltiplas sequências-alvo numa mesma amostra, sendo uma abordagem bastante empregada em estudos de epidemiologia molecular. Com o *Rolling Circle Amplification* (RCA), torna-se possível a utilização de sondas específicas para cada iniciador onde as mesmas poderão então se ligar aos amplicons para os quais são específicas, circularizando os produtos de PCR, sendo que somente serão circularizados os amplicons com a sequência completa, os produtos não circularizados, que são inespecíficos, não serão amplificados, aumentando significativamente sua especificidade, além de permitir um maior número de marcadores a serem utilizados numa mesma reação. O presente projeto visa a genotipagem de protozoários patogênicos, usando uma abordagem interdisciplinar envolvendo metodologias de biologia molecular (PCR *multiplex*, RCA e sequenciamento) e bioinformática (análises de evolução e filogenia molecular). Genes ortólogos universais comuns aos protozoários serão identificados e usados como marcadores gerais para genotipagem de protozoários parasitas, visando obter uma caracterização inter-específica mais acurada de parasitas de interesse veterinário como *Trypanosoma evansi* e *T. vivax*, além daqueles de importância à saúde pública como *T. cruzi*, *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *Plasmodium falciparum* e *P. Vivax*.

Patologia / Patogenia

Resumo 048

Alterações comportamentais na doença de Chagas experimental crônica: comportamento depressivo responde à terapia com fluoxetina e benznidazol

Glauca Vilar-Pereira¹, Leonardo Alexandre de Souza Ruivo¹, Andrea Alice da Silva², Isabela Resende Pereira¹, Joseli Lannes-Vieira¹

1 Laboratório de Biologia das Interações, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, Brasil

2 Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal Fluminense, Brasil

vilar@ioc.fiocruz.br

Desde a descoberta da doença de Chagas (DC), sabe-se que o *Trypanosoma cruzi* acomete o sistema nervoso central (SNC). A existência da forma nervosa da doença de Chagas (DC) é matéria de discussão desde a descrição de alterações neurológicas, de aprendizado e psíquicas por Carlos Chagas. Pouco se conhece sobre a fisiopatogenia das alterações comportamentais na DC, sendo proposto que estas são consequências da presença do parasito no SNC. O parasito pode ser observado dentro das células gliais como os astrócitos e micróglia. Visando ao entendimento da fisiopatogenia das alterações comportamentais da DC, reproduzimos em modelo de infecção experimental em camundongos C57BL/6 aspectos importantes da DC. Inicialmente, tivemos como objetivo investigar as alterações comportamentais (ansiedade e depressão) durante a infecção experimental crônica (150 dias pós-infecção, dpi) pelo *T. cruzi*. Mostramos que camundongos C57BL/6 infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi* apresentam alterações comportamentais como: (i) comportamento depressivo com o aumento da imobilidade nos testes do nado forçado (FST) e suspensão de cauda (TS), (ii) alterações na coordenação motora ao teste de rotarod e (iii) ansiedade avaliada no teste labirinto em cruz elevado. Estas alterações não são associadas com doenças neuromusculares (avaliadas no teste de força de preensão) e comportamento associado à doença (analisado pela temperatura e perda de peso), que poderiam interferir no desempenho dos animais nos testes comportamentais. Ainda, para entender a fisiopatologia da depressão em DC, os animais cronicamente infectados (120 dpi) foram tratados com fluoxetina (Fx), durante 30 dias consecutivos. Terapia Fx reverteu o comportamento depressivo, reduzindo o tempo de imobilidade no TS, o que sugere contribuição de componente neurológico. Também, desafiamos a participação do parasita no comportamento depressivo na infecção experimental crônica, usando a droga tripanossomicida benznidazol (Bz), administrado diariamente por gavagem. O tratamento com Bz na infecção aguda (15 a 45 dpi) impediu o comportamento depressivo na fase crônica da infecção (90 dpi). Terapia Bz na fase crônica (120 a 150 dpi) reduziu o tempo de imobilidade no TS, revertendo o comportamento depressivo na infecção crônica. Estes resultados indicam que, além de um componente neuroquímico (serotonina), o parasita toma parte na patogênese das alterações comportamentais na infecção experimental crônica pelo *T. cruzi*. Assim, estes resultados sugerem que as alterações comportamentais na DC não estão restritos a fatores psicológicos, mas podem residir em uma rede complexa de interações desencadeadas pelo parasita *T. cruzi*.

Palavras-chave: doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, alteração comportamental, depressão, fluoxetina, benznidazol.

Suporte financeiro: CNPq e FAPERJ.

Patologia / Patogenia

Resumo 117

ESTUDO DE CASOS CLÍNICOS SOBRE A DOENÇA DE CHAGAS

Angélica Kariny Costa de Lima
Jaline Coutinho Silvério
Diana praia Borges Freire
Bio-Manguinhos, Fiocruz.

Trypanosoma cruzi é o protozoário intracelular causador da doença de Chagas, moléstia que está entre as mais importantes endemias vigentes no continente americano. Essa infecção parasitária desenvolve, muitas vezes, em seres humanos, expressivos distúrbios digestivos, porém a principal manifestação da doença é a cardiopatia chagásica, caracterizada por parasitismo, inflamação e fibrose progressiva que pode se manifestar entre 10 e 30 anos após a infecção. Pode ser transmitida por via transfusional, congênita ou por insetos vetores triatomíneos que contraem o parasita em seu reservatório natural. Para a prevenção, devem ser tomadas medidas climáticas, biológicas, ecológicas, fisiológicas, imunológicas, sociais, culturais e econômicas. O diagnóstico da doença é realizado por métodos parasitológicos, radiológicos e sorológicos. Desde a descoberta da doença até os dias atuais, algumas drogas foram testadas contendo compostos ativos contra o *T. cruzi*. Os testes clínicos divulgam apenas o benzonidazol e o nifurtimox como medicamentos para o tratamento, porém são contra indicados para mulheres grávidas e pacientes com insuficiência renal ou hepática e a intolerância a essas drogas pode causar diversos efeitos colaterais. Foram utilizados como fonte de informação artigos científicos e livros relacionados à doença de Chagas. Cinco artigos científicos, apresentando estudos de casos clínicos correlacionados a esta doença foram selecionados, e analisados com o objetivo de expor e descrever os principais aspectos desta doença.

Dentre os cinco artigos selecionados, o primeiro intitulado: %Associação entre megacólon chagásico e adenocarcinoma gástrico em mulher idosa+relata a doença de Chagas com quadro clínico evoluído para megacólon chagásico. O segundo artigo: %Relato de estudo de caso sobre arritmia cardíaca em paciente chagásico+relata uma portadora da doença de Chagas com cardiopatia chagásica crônica. O terceiro artigo: %Doença de Chagas congênita por infecção aguda maternal por *Trypanosoma cruzi* transmitida via oral+relata uma família de quatro pessoas incluindo uma mulher que com doze semanas gestacionais foi diagnosticada positiva para a doença. O quarto artigo: %Disfagia em pacientes com doença de Chagas e divertículo de Zenker+descreve o caso clínico de dois pacientes. O quinto artigo: %Doença de Chagas congênita com manifestações polimórficas+relata uma paciente portadora da doença e com diagnóstico de insuficiência cardíaca.

Medidas devem ser adotadas a fim de contribuir para a prevenção desta parasitose. Atualmente não existem tratamentos eficazes contra esta doença, mas o diagnóstico rápido e o tratamento dos sintomas permitem manter uma terapia que promova uma melhor qualidade de vida e sobrevida reduzindo os severos efeitos adversos.

Patologia / Patogenia

Resumo 149

A exportação prematura de timócitos duplo negativos na infecção por *Trypanosome cruzi* é restrita aos receptores de esfingosina e associada com a doença de Chagas humana

*Ailin Lepletier, Liliane de Almeida, Luzia da Silva Sampaio, Bruno Paredes, Leonardo Santos, Florencia Belén González, Juan Beloscar, Oscar Bottasso, Marcelo Einicker-Lamas, Ana Rosa Pérez, Wilson Savino, Alexandre Morrot**

A infecção por *Trypanosoma cruzi* afeta a homeostasia do timo, induzindo alterações no microambiente tímico e compartimento linfóide. Especificamente, a fase aguda da infecção é caracterizada por severa atrofia do órgão e aumento da saída de timócitos imaturos para periferia do sistema imune. Até o presente estudo ser concluído, os efeitos fisiopatológico das mudanças promovidas pelo parasita no timo que resultam na exportação precoce de timócitos permaneciam uma incógnita. Em um trabalho realizado através de uma parceria do Instituto Oswaldo Cruz, com o Instituto de Microbiologia da UFRJ e o Serviço de Clínica Médica do Hospital J.B. Iturraspe de Santa Fe, Argentina, demonstramos que a esfingosina-1-fosfato (S1P) é um potente mediador de quimiotaxia de células T, desempenhando um papel fundamental na saída de timócitos imaturos duplamente negativos (CD4⁻CD8⁻) para a periferia durante a doença de Chagas experimental. No timo de camundongos infectados com *T. cruzi*, cepa Tuluahuén, detectamos diminuição da transcrição de S1P quinases 1 e 2 genes relacionados com a biossíntese de S1P, em conjunto com o aumento da transcrição do gene da esfingosina-1-liase SGPL1, cujo produto inativa S1P. Essas alterações foram associadas com níveis intratímicos reduzidos de S1P bioativo. Curiosamente, os timócitos CD4⁻CD8⁻ de animais infectados expressam níveis elevados do receptor S1P durante a infecção, e migraram mediante concentrações mais baixas de S1P. Além disso, durante a infecção por *T. cruzi*, este subconjunto de timócitos expressa níveis elevados de citocinas IL-17 e TNF- α após estimulação policlonal. O tratamento *in vivo* com o antagonista do receptor de S1P, FTY720, resultou na recuperação do número de timócitos CD4⁻CD8⁻ no timo de animais infectados para níveis fisiológicos. Por fim, demonstramos aumento dos números de células T imaturas CD4⁻CD8⁻ no sangue periférico de pacientes apresentando doença cardíaca severa decorrente da doença de Chagas.

Quimioterapia (drogas e esquemas de tratamento etiológico)

Resumo 047-B

TERAPIA COMBINADA BENZNIDAZOL-PENTOXIFILINA REDUZ CARGA PARASITÁRIA E SUSTENTA A REVERSÃO DA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA EXPERIMENTAL

Isabela Resende Pereira¹, Glaucia Vilar-Pereira¹, Otacilio Cruz Moreira², Andrea Alice da Silva¹, Constança Britto², Joseli Lannes-Vieira¹

¹Laboratório de Biologia das Interações, ²Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, IOC-Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

A cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é caracterizada pela persistência do parasito, inflamação e fibrose progressiva com alterações eletrocardiográficas. Anteriormente, a gravidade da CCC foi associada com a intensidade do parasitismo cardíaco e o aumento dos níveis séricos do fator de necrose tumoral (TNF) e do óxido nítrico (NO). Atualmente, os tratamentos apenas aliviam os sintomas da CCC. Aqui, usamos o benznidazol droga tripanossomicida (Bz) associado a um agente imunomodulador/cardioprotetor pentoxifilina (PTX) para interferir com a carga parasitária e com o microambiente inflamatório e função cardíaca com o objetivo de melhorar a CCC. Em camundongos cronicamente infectados com o *Trypanosoma cruzi*, a terapia Bz-PTX reduziu a expressão de TNF, do receptor 1 de TNF (TNFR1 /p55) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no coração e diminuiu as concentrações de TNFR1 solúvel e NO no soro. Além disso, a terapia de Bz-PTX reduziu a fibrose e carga de parasitas no tecido cardíaco e ainda reverteu as alterações elétricas já instaladas. Os níveis de NO e sTNFR1 foram relacionados aos graus de lesão cardíaca, podendo ser usados como biomarcadores de lesão cardíaca. De forma importante, a reversão das alterações elétricas se manteve mesmo após 30 dias do final da terapia. Portanto, Bz combinado a PTX controla o parasito e melhora a função elétrica, tornando esta uma estratégia viável para o tratamento da forma cardíaca da doença de Chagas.

Suporte: CNPq e FAPERJ.

Quimioterapia (drogas e esquemas de tratamento etiológico)

Resumo 134

The analysis of benznidazole effect under the use of different mouse models of *Trypanosoma cruzi* infection

Guedes-da-Silva, FH¹; Batista, DGJ¹; França, CF¹, Meuser, MM¹, Rocha, MS¹; Araújo, JS¹; Ferreira, CG¹, Moreira, OC², Britto, C², Lepesheva, G.L³ and Maria de Nazaré C. Soeiro^{1*}

¹Laboratório de Biologia Celular, ²Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ³Vanderbilt Institute for Global Health, Vanderbilt University, Nashville, TN, 37232, USA.

The nitroderivatives benznidazole and nifurtimox are the only current alternatives for Chagas Disease (CD) treatment. However both have several limitations justifying safer and more efficient therapies. Recently two antifungal drugs, posaconazole and E1224 (the prodrug of ravuconazole), were evaluated as potential antichagasic drugs on chronic patients but unfortunately both displayed high (70-80%) rates of therapeutic failure. It has been suggested that at least part of this unexpected failure could be due to the lack of translation from *in vitro* and *in vivo* models to the clinic and that a redesign of the current screening strategy during the drug discovery process should be considered. Therefore, we evaluated the effects and outcomes of the treatment with benznidazole by assaying different gender of mouse models of *T. cruzi* infection using different parasite strains. Our results corroborate previous data demonstrating that female mice are less vulnerable to *T. cruzi* infection than males, which are also less susceptible to the anti-parasitic effect of benznidazole. Our study aims to contribute to the development of more reliable methodologies and decision gates for *in vivo* assays of novel anti-parasitic compounds in order to move them from pre-clinical to clinical trials of CD.

Financial support: CAPES, CNPq, FAPERJ, Fiocruz, PDTIS, Vanderbilt University.

Quimioterapia (drogas e esquemas de tratamento etiológico)

Resumo 135

Efeito do tratamento com lovastatina sobre a recuperação da microcirculação cerebral durante a doença de Chagas aguda em modelo murino

Beatriz Matheus de Souza Gonzaga, Lindice Mitie Nisimura, Fabiana Gomes, Vanessa Estato, Isabeli Barbieri, Eduardo Tibiriçá, Luciana Ribeiro Garzoni
Laboratório de Investigação Cardiovascular, IOC - Fiocruz

Introdução: Apesar de alterações do sistema nervoso central ocorrerem na doença de Chagas (DC) tanto em modelos experimentais (Silva et al., 2007; Vilar-Pereira et al., 2012) como em humanos (Carod-Artal et al., 2005; Py, 2011), pouco se sabe sobre o papel da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* sobre a microcirculação cerebral. Recentemente nosso grupo demonstrou que a infecção aguda pelo *T. cruzi* (cepa Y) causa importante microvasculopatia cerebral em camundongos Swiss Webster através da indução de disfunção endotelial, diminuição da densidade capilar funcional e aumento de *rolling* e adesão de leucócitos (Nisimura et al., 2014). Baseados em dados que demonstram os efeitos pleiotrópicos das estatinas que incluem ação anti inflamatória, melhora da função endotelial (Liao, 2005), ação tripanocida (Urbina et al., 1993 ; Melo et al., 2011) entre outros e que o tratamento com lovastatina reverteu os danos funcionais da microcirculação cerebral em modelo murino de malária e sepse (Reis et al., 2012), nossa hipótese de trabalho é de que o tratamento com lovastatina irá reverter a microvasculopatia cerebral durante a fase aguda da DC.

Objetivos: Avaliar o efeito do tratamento com lovastatina sobre a microcirculação cerebral através da análise da microcirculação funcional e expressão de VE-caderina que atua na formação de junções aderentes e manutenção da permeabilidade vascular.

Metodologia: Camundongos machos Swiss Webster inoculados intraperitonealmente com 10^4 formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi* foram tratados a partir de 24h de infecção com 20mg/Kg/dia de lovastatina via oral. Parâmetros parasitológicos e clínicos foram avaliados bem como a expressão de VE-caderina através de Western blot.

Resultados e conclusão: Nossos resultados preliminares demonstraram que no nosso modelo de estudo o tecido cerebral apresentou ninhos de parasitas no 15° e 22° dpi e nódulos de resolução no 22° dpi demonstrando que o parasita é capaz de invadir o sistema nervoso central. O tratamento com lovastatina não foi capaz de alterar a parasitemia, o peso e a mortalidade (n=2) dos animais. As análises por western blot demonstram redução na expressão de VE-caderina durante a infecção pelo *T. cruzi* e recuperação aos níveis de expressão dos animais controles após o tratamento (n=2)

Perspectivas: A elaboração de um score clínico está sendo realizada e estudos através de microscopia intravital estão em andamento para análise da microcirculação funcional no cérebro dos animais frente ao tratamento com lovastatina. Além disso, a análise da expressão de outras proteínas envolvidas na função vascular serão realizadas.

Apoio Financeiro: FAPERJ, CNPq, Fiocruz

Quimioterapia (drogas e esquemas de tratamento etiológico)

Resumo 140

Avaliação *in vitro* do perfil de toxicidade de novos bioprodutos

Rayane Nogueira Alves, Maria de Nazaré Correia Soeiro e Cristiane França da Silva

Laboratório de Biologia Celular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

A doença de Chagas, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* é uma patologia negligenciada com grande impacto na saúde pública de áreas endêmicas (países da América Latina) e não endêmicas (Europa e Ásia) frente a migração de portadores. Atualmente dois fármacos são usados no tratamento desta enfermidade, o nifurtimox e o benznidazol, porém ambos são apenas parcialmente eficazes e apresentam efeitos colaterais, sendo necessária a busca por novos compostos mais eficientes e menos tóxicos. Assim, se faz necessária a busca por metodologias que determinem precocemente a toxicidade de compostos nas fases iniciais dos testes pré-clínicos. Neste estudo testamos novas biomoléculas (06 extratos de fungos filamentosos e plantas da família *Fabaceae*) sobre células musculares cardíacas de cultivo primário (camundongos suíços) avaliando, após exposição por 24 e 48h com os compostos acima descritos, diferentes parâmetros incluindo: (i) morfologia e, densidade e fisiologia celular (contratibilidade) por microscopia óptica e (ii) viabilidade mitocondrial por metodologias colorimétricas como MTT e presto blue. Nossos dados mostram que todos extratos somente exibiram toxicidade na maior concentração testada (200ug/mL), sendo que o teste de PrestoBlue revelou-se mais correlato aos achados obtidos por microscopia óptica (arredondamento celular, perda de contratibilidade e de densidade celular). Nossa próxima etapa será analisar o efeito tripanocida destes extratos sobre formas tripomastigotas e amastigotas de *T.cruzi* visando contribuir para a identificação de terapias alternativas para doença de Chagas.

Apoio: PDTIS/Fiocruz, CNPq, FAPERJ, CAPES and Fiocruz.

Terapias (imunoterapia, terapia celular e outras)

Resumo 047-A

EFEITOS DA PENTOXIFILINA SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA NA CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA EXPERIMENTAL

Isabela Resende Pereira¹, Glaucia Vilar-Pereira¹, Otacilio Cruz Moreira², Isalira Peroba Ramos⁴, Daniel Gibaldi¹, Constança Britto², Milton Ozório Moraes³, Joseli Lannes-Vieira

¹Laboratório de Biologia das Interações, ²Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, ³Laboratório de Hanseníase, IOC-Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil,

⁴Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil

A doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma das principais causas de morte por insuficiência cardíaca na América Latina. A pentoxifilina (PTX), um derivado da metilxantina, tem sido descrita ter efeito imunomodulador, anti-tumor e cardioprotetor. No presente estudo utilizamos um modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) moderada para averiguar os efeitos da terapia com PTX na progressão ou reversão da forma cardíaca da DC. Verificamos que a PTX não tem ação sobre o *T. cruzi*, não alterando a carga parasitária, que se mantém em baixos níveis mesmo após o tratamento. Entretanto, a terapia com PTX reduziu significativamente a lesão cardíaca, caracterizada por diminuição significativa da miocardite e deposição de fibronectina. Também, a terapia com PTX preservou a expressão de conexina-43 no tecido cardíaco e diminuiu a atividade de CK-MB em soro, um biomarcador de lesão miocárdica. Em relação à funcionalidade cardíaca, os camundongos tratados com PTX apresentaram redução das arritmias e bloqueios atrioventriculares, anormalidades elétricas clássicas da DC, com diminuição da dilatação dos ventrículos e aumento da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Estes resultados demonstram que o tratamento com PTX na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* impede o desenvolvimento da CCC grave e mais do que isto, reverte diversas alterações cardíacas detectadas antes da terapia. Estes resultados fazem deste fármaco um potencial candidato a componente de tratamento multi-terapêutico da forma cardíaca da DC.

Suporte: CNPq e FAPERJ.

Terapias (imunoterapia, terapia celular e outras)

Resumo 143

Efeito do tratamento com GW788388 na atividade da via de sinalização de TGF- β durante a fase crônica da doença de Chagas - modelo experimental murinho

Rayane da Silva Abreu¹, Roberto Rodrigues Ferreira¹, Gláucia Villar², Wim Degrave¹, Tania de Araújo-Jorge³, Joseli Lannes Vieira² e Mariana Caldas Waghbi¹

¹Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, ²Laboratório de Biologia das Interações, ³Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro RJ, Brazil.

Estudos desenvolvidos pelo grupo nos últimos anos demonstram o envolvimento do TGF- β na cardiopatia chagásica de animais infectados pelo *T. cruzi* na fase aguda da doença de Chagas. Observa-se ativação da via de sinalização de TGF- β no tecido cardíaco dos animais infectados, resultando no aumento da expressão das proteínas de matriz extracelular. Esse processo fibrótico envolve a substituição do tecido cardíaco danificado, por tecido conjuntivo, podendo levar ao comprometimento funcional do coração e o TGF- β destaca-se como um dos principais reguladores desse processo. Este projeto se baseia na investigação do efeito do tratamento com GW788388 na atividade da via de sinalização do TGF- β em um modelo experimental crônico da doença de Chagas. Para isso, animais C57Bl/6 foram infectados com *T. cruzi* Cepa colombiana (10^2) e tratados com 3mg/Kg GW788388 após 120 dias de infecção em dois diferentes esquemas de tratamento: (i) uma vez por semana ou (ii) 3 vezes por semana por via oral. Foram realizados eletrocardiogramas após 120 e 150 dpi, antes e após o tratamento, respectivamente. O coração dos animais foi retirado e proteínas totais foram extraídas para investigação da expressão de fibronectina e colágeno tipo I, dos animais infectados tratados ou não com GW788388, pela técnica de *Western blot*. Além disso, foi realizada a avaliação da deposição de colágeno no tecido cardíaco dos animais por técnicas histológicas de forma a confirmar os dados de *Western blot*. Também foram avaliados os níveis de TGF- β circulante por ELISA. Nossos resultados demonstram que o modelo de estudo escolhido apresenta 100% de acometimento após 120 dias de infecção. O tratamento com GW788388 melhorou o quadro eletrocardiográfico dos animais infectados: reduziu a bradicardia, o intervalo PR e a duração da onda P. Além disso, o tratamento com GW-788388 3x por semana foi capaz de reverter o aumento da expressão de colágeno no coração dos animais infectados. O mesmo efeito não foi observado em relação à expressão de fibronectina no coração. A infecção crônica leva a um aumento nos níveis de TGF- β circulantes, e o tratamento com GW788388 foi capaz de reverter estes níveis de forma significativa. Até o momento, os resultados são promissores e indicam uma nova possibilidade de tratamento da fibrose observada na fase crônica da doença de Chagas.

Vetor, ciclos de transmissão, ecologia e biodiversidade

Resumo 018 (Apresentação Oral)

Phytophagy in Triatomines: the Missing Link in the Eco-epidemiology of Chagas Disease.

Díaz-Albiter, H.M.¹, Ferreira, T.N.¹, Costa, S.G.¹, Rivas, G.B.¹, Gumiel M.X.¹, Cavalcante, D.R.^{3,4}, Gonzalez, M.S.^{3,4}, Mello, C.B.,^{3,4} Bruno, R.V.¹, Garcia, E.S.¹, Lima, M.M.¹, Castro, D.P.¹, Dillon R.J.², Azambuja, P.¹, Genta, F.A.^{1,3}

1 IOC-FIOCRUZ, RJ, Brazil, 2 Lancaster University, UK, 3 UFF, RJ, Brazil 4 INCT-EM, Brazil (Financiamento FIOCRUZ, CAPES, CNPq, FAPERJ, The LeverHulme Trust)

INTRODUCTION Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and transmitted by triatomines. This group includes over 130 species distributed from Northern USA to Patagonian Argentina. Recently, there have been several cases of oral *T. cruzi* infection in South America, mostly attributed to contamination of wild and cultivated fruits with infected triatomine faeces. Triatomines are associated to plant species such as bromeliads and palm trees which provide shelter and attract blood sources. Triatomine bugs have been described as obligatory haematophagous insects, although their order Hemiptera includes many phytophagous species. Evidence of phytophagy in triatomines might dramatically change our current views on the eco-epidemiology of Chagas disease. METHODS 1st instar *R. prolixus* were allowed to feed ad libitum on cherry tomatoes *Solanum lycopersicum*. Insect survival, activity and weight were registered. Insects were assayed for presence of gut carbohydrase activity, tomato DNA and parasitemia after *T. cruzi* infection. Gut DNA from wild triatomines from Northeast Brazil was used to PCR-amplify plant-specific targets which were sequenced and identified by BLAST. RESULTS AND DISCUSSION Insects allowed to feed on tomatoes presented a longer lifespan, were more active and heavier than non-fed controls. Insects were exposed to tomatoes ad libitum for 20-30 days. Although it was not possible to register a feeding event, tomato DNA was detected in insect homogenates. Moreover, carbohydrase activity of gut extracts was higher in experimental insects. Negative controls had no access to any source of carbohydrates. This enzymatic activity was not due to cannibalism, since experiments were also performed in individual vials with the same behavior. The fact that an artificial *T. cruzi* infection with tomato-fed triatomines exhibited lower numbers of parasites was quite interesting and opened a whole new set of questions. To find out if phytophagy also happened in the wilderness and was not an artifact, we sampled wild triatomines from Northeastern Brazil. Six plant sequences were found in gut DNA extracts of wild triatomines. One could envision a scenario where triatomines are using plants as alternative energy sources until they have access to a blood meal. If this behavior is present in other populations of triatomines, the eco-epidemiology of Chagas disease might have a new element that has not been considered before. This is the first demonstration of phytophagy in triatomines, which might open new avenues for Chagas disease control such as plant-based attractants or plants as delivery agents for anti-trypansomatid molecules.

Vetor, ciclos de transmissão, ecologia e biodiversidade

Resumo 098

Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods

Gumiel M¹, da Mota FF^{2,5}, Rizzo VS¹, Sarquis O³, Castro DP^{1,5}, Lima MM³, Garcia ES^{1,5}, Carels N^{4*}, Azambuja P^{1,5}

¹Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ²Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ³Laboratório de Ecoepidemiologia da Doença de Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁴Laboratório de Modelagem de Sistemas Biológicos, National Institute for Science and Technology on Innovation in Neglected Diseases (INCT-IDN), Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁵Departamento de Entomologia Molecular, Instituto Nacional de Entomologia Molecular (INCT-EM), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Abstract. Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted by triatomine vectors. The northeastern region of Brazil is endemic for Chagas disease and has the largest diversity of triatomine species. *T. cruzi* development in its triatomine vector depends on diverse factors, including the composition of bacterial gut microbiota.

We characterized the triatomines captured in the municipality of Russas (Ceará) by sequencing the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene. The composition of the bacterial community in the gut of peridomestic *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* was investigated using culture independent methods based on the amplification of the 16S rRNA gene by polymerase chain reaction (PCR), denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), DNA fragment cloning, Sanger sequencing and 454 pyrosequencing. Additionally, we identified TcI and TcII types of *Trypanosoma cruzi* by sequencing amplicons from the gut metagenomic DNA with primers for the mini-exon gene. Triatomines collected in the peridomestic ecotopes were diagnosed as *Triatoma pseudomaculata* and *Triatoma brasiliensis* by comparing their COI sequence with GenBank. The rate of infection by *Trypanosoma cruzi* in adult triatomines reached 80% for *Triatoma pseudomaculata* and 90% for *Triatoma brasiliensis*. The DNA sequences from the DGGE bands indicated that the triatomine gut microbiota was primarily composed of Proteobacteria and Actinobacteria. However, Firmicutes and Bacteroidetes were also detected, although in much lower proportions. *Serratia* was the main genus, as it was encountered in all samples analyzed by DGGE and 454 pyrosequencing. Members of Corynebacterinae, a suborder of the Actinomycetales, formed the next most important group. The cloning and sequencing of full-length 16S rRNA genes confirmed the presence of *Serratia marcescens*, *Dietzia* sp., *Gordonia terrae*, *Corynebacterium stationis* and *C. glutamicum*. The study of the bacterial microbiota in the triatomine gut has gained increased attention because of the possible role it may play in the epidemiology of Chagas disease by competing with *T. cruzi*. Culture independent methods have shown that the bacterial composition of the microbiota in the guts of peridomestic triatomines is made up by only few bacterial species.

Vetor, ciclos de transmissão, ecologia e biodiversidade

Resumo 107

ESTUDO DE AVALIAÇÃO DE TAXAS DE INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* E MEDIDA DE CARGA PARASITÁRIA EM TRIATOMÍNEOS CAPTURADOS EM DOIS BIOMAS BRASILEIROS ATRAVÉS DO USO DE ENSAIOS MOLECULARES BASEADOS NA PCR

Verly, T.S.¹, Rocha, N.², Almeida, M.², Misael, D.²; Finamore, P.¹, Rodrigues-Santos, I., Bedin, C.³, Mello, F.⁴, Moreira, O.¹, Mallet, J.², Britto, C.¹

¹Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas; ²Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, FIOCRUZ/RJ; ³Divisão de Vigilância Ambiental em Saúde, Centro Estadual de Vigilância em Saúde-RS; ⁴SRV-LACEN-FEPPS-SES-RS

Apesar de em 2006 o Brasil ter recebido a certificação internacional de eliminação do *Triatoma infestans*, existindo somente focos residuais, as alterações nos biomas aumentam o potencial de outras espécies de triatomíneos na transmissão do *Trypanosoma cruzi*. O método clássico de descrição de infecção natural de triatomíneos por *T. cruzi* é o exame microscópico. Contudo, este apresenta baixa sensibilidade e reprodutibilidade, dificuldade de exame nos diferentes estágios evolutivos dos insetos, necessidade da análise em insetos frescos, além de ser um procedimento laborioso e demorado. Metodologias baseadas na PCR podem suprir estas limitações, tornando o diagnóstico molecular de detecção do DNA de *T. cruzi* nos triatomíneos a técnica mais adequada. A utilização de metodologias baseadas em PCR, qualitativa e em tempo real (qPCR), permite a detecção e quantificação acurada do parasito em variadas amostras, além de gerar resultados em poucas horas. Assim, empregamos o ensaio de PCR *multiplex* desenvolvido pelo nosso grupo, para a detecção simultânea do DNA cinetoplástico de *T. cruzi* e subunidade 12S do gene ribossomal de triatomíneos para a análise de infecção natural em, no mínimo, 500 insetos triatomíneos coletados em Santana do Cariri e Santa Quitéria no Ceará (CE) e em cinco municípios do Rio Grande do Sul (RS). Para a estimativa da carga parasitária por qPCR, foram realizados ensaios de quantificação absoluta utilizando o sistema TaqMan também em *multiplex*, com o mesmo alvo para triatomíneos e empregando o DNA nuclear satélite de *T. cruzi* para a quantificação do parasito. Após a padronização, foi realizado o diagnóstico molecular em 257 insetos de 450 capturados nos municípios do RS e em 118 insetos de 261 capturados no CE. No RS foram observados 6 triatomíneos parasitados (2,3%). No distrito de Santa Quitéria, 7 insetos estavam positivos e em Santana do Cariri foram encontrados 11 hemípteros parasitados, revelando uma taxa de infecção de 15,3% nas áreas estudadas do Ceará. Através da qPCR foi possível quantificar a carga parasitária, variando entre 10^2 e 10^{11} equivalentes de parasitos/intestino, entre as amostras positivas para *T. cruzi* em Santa Quitéria. Não foram observados insetos positivos através do exame a fresco, indicando a maior sensibilidade da técnica molecular. Espera-se que o presente estudo possibilite a identificação da dinâmica de transmissão do parasito a partir da caracterização de suas linhagens e identificação de possíveis novas fontes alimentares das espécies de triatomíneos coletadas no Pampa (RS) e Caatinga (CE), contribuindo para o controle epidemiológico da doença de Chagas.

FINANCIADORES: FAPERJ . Doenças Emergentes e Negligenciadas, Universal CNPq, PROEP/CNPq.

Vetor, ciclos de transmissão, ecologia e biodiversidade

Resumo 132

Análise isoenzimática da variabilidade fenotípica de triatomíneos do complexo *Triatoma brasiliensis* do estado de Pernambuco, Brasil

Gumiel, M. ¹, Lima-Neiva, V. ², Dale, C. ², Oliveira, G. ³, Pacheco, R. S. ⁵, Dujardin, J. P. ⁴, Costa, J. ².

1. Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Insetos. Instituto Oswaldo Cruz. Fiocruz.
2. Laboratório de Biodiversidade Entomológica. Instituto Oswaldo Cruz. FIOCRUZ
3. Secretaria-Executiva de Vigilância em Saúde. Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco
4. Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Université de Montpellier.
5. Laboratório de Sistemática e Bioquímica. Instituto Oswaldo Cruz. Fiocruz.

Introdução. A doença de Chagas é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É transmitida ao homem e outros mamíferos, principalmente, através das fezes infectadas dos triatomíneos. Na região nordeste, após o controle de *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis brasiliensis* é assinalada como o principal vetor, e esta incluído no complexo: *Triatoma brasiliensis*+ juntamente com *T. b. macromelasoma*, *T. juazeirensis*, *T. melanica* e *T. sherlocki*.

Pernambuco é um dos estados que além de apresentar casos crônicos de doença de Chagas, possui altos índices de infestação domiciliar por triatomíneos. Estudos sobre a distribuição de membros do complexo *T. brasiliensis* nesse estado, revelaram uma alta variabilidade fenotípica de *T. b. macromelasoma*, indicando a possível existência de área de hibridação natural.

O êxito no combate ao vetor se fundamenta na elaboração de planos de vigilância e controle baseados na correta identificação dos insetos. Para algumas espécies esse processo é mais complexo e o uso de métodos alternativos auxilia essa identificação. Entre as técnicas utilizadas podemos citar a eletroforese de isoenzimas, que avalia a variabilidade genética. Os perfis isoenzimáticos podem ser correlacionados com aspectos biológicos, ecológicos, comportamentais e também com a capacidade vetorial. Estas informações são imprescindíveis para a aplicação dos métodos de controle mais precisos.

Objetivo. Comparar os diferentes fenótipos encontrados no Estado de Pernambuco com os membros do complexo *T. brasiliensis* já caracterizados na literatura utilizando a eletroforese de isoenzimas.

Materiais e métodos. Foram utilizados tórax de 107 espécimes do complexo *Triatoma brasiliensis*: *T. b. brasiliensis*, *T. b. macromelasoma* (de diferentes localidades de Pernambuco) e *T. juazeirensis* (Bahia) e *T. pseudomaculata* (grupo externo). A maceração e preparação seguiram a metodologia de Shaw e Prasad, 1970. A eletroforese e revelação foram feitos seguindo a metodologia de Momen *et al.* (1985) e Costa *et al.* (1997).

Resultados. Dos 10 sistemas isoenzimáticos testados, todos mostraram padrões monomórficos de bandejamento. As enzimas MDH, MPI e IDH mostraram padrões diferenciados para alguns espécimes.

Na análise fenética, os espécimes foram agrupados em dois clusters, sendo um correspondente aos espécimes de *T. b. brasiliensis* e outro aos de *T. juazeirensis* (BA) e *T. b. macromelasoma*. Cinco diferentes genótipos ou variantes isoenzimáticas foram detectados e a diversidade genética foi de 4.3%.

Conclusão. A utilização da eletroforese para a detecção de híbridos não foi conclusiva, entretanto, os diferentes fenótipos foram agrupados com *T. b. macromelasoma* confirmando que esses espécimes fazem parte do complexo *T. brasiliensis* corroborando resultados moleculares e morfométricos anteriores.

Financiamento: Capes / CNPq

