

30.001

THE POSSIBLE ROLE OF THE HSP65 OF *MYCOBACTERIUM LEPRAE* CATALYTIC PROPERTIES IN AUTOIMMUNE DISEASES: EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE UVEITIS [EAU] AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS [SLE]. <sup>1</sup>Portaro, F.; <sup>2</sup>Marengo, E. B.\*\*; <sup>3</sup>Comodoro, A. G.\*\*; <sup>3</sup>Moraes, L. D. V.; <sup>4</sup>Parada, C.\*\*; <sup>5</sup>Fernandes, B. L.; <sup>4</sup>Camargo, A. C. M.; <sup>3</sup>Rizzo, L. V.; <sup>6</sup>Sant'Anna, O. A. <sup>1</sup>Toxicologia, Instituto Butantan; <sup>2</sup>Toxinologia UNIFESP; <sup>3</sup>Imunologia Clínica USP; <sup>4</sup>Toxinologia Instituto Butantan; <sup>5</sup>Microbiologia ICB-USP; <sup>6</sup>Microbiologia-Imunologia Instituto Butantan

**Objetivo:**

The hsp60s are molecular chaperones that guide several steps during protein synthesis, transport and degradation. They are abundant in prokaryotic and eukaryotic cells and highly conserved during evolution. Both the microbial and mammalian hsp60 are the major targets for the immune response against infectious agents. The amino acid sequence alignment of *M. leprae* Hsp65 [chaperonin 2] and *E. coli* HsIVU protease suggests two putative threonine catalytic groups, one in the N-domain [Thr<sup>136</sup>Lys<sup>168</sup>Tyr<sup>264</sup>] and the other in the C-domain [Thr<sup>375</sup>Lys<sup>409</sup>Ser<sup>502</sup>]; mutagenesis studies showed that the amino acid residues T<sup>375</sup>K<sup>409</sup>S<sup>502</sup> at the C-domain form the catalytic group carries out the main proteolytic activity of the *M. leprae* hsp65. In the present study the putative pathophysiological role of the proteolytic activity of this hsp65 in autoimmune diseases was under evaluation

**Métodos e Resultados:**

Experimental autoimmune uveitis [EAU] induced by immunization of the highly susceptible B10.RIII mouse with the Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein [IRBP], and the spontaneous Systemic Lupus Erythematosus [SLE] developed by the [NZB x NZW] F1 inter strains hybrids were studied. The individuals anti IRBP or anti nucleus antibody titers were determined, as well as disease scores.

**Conclusões:**

The preliminary results suggest that B10.RIII mice intraperitoneally treated with 7 or 14 µg of hsp65 develop EAU of a significantly higher incidence and severity that does not correlates with the IgG1 and IgG2a anti- IRBP levels. In SLE, the anti-DNA titers was significantly elevated between of the animal controls and treated with 7 µg of hsp65 ( $P < 0,001$ )

30.002

*HELICOBACTER PYLORI* EM PACIENTES COM ÚLCERA E GASTRITE: DETECÇÃO PELA NESTED PCR E GENOTIPAGEM PELO GENE UREASE C. <sup>1</sup>Roesler, B. M.; <sup>2</sup>Menoni, S. M. F.; <sup>1</sup>Bonon, S. H. A.; <sup>3</sup>Zeitune, J. M. R.; <sup>1</sup>Costa, S. C. B.; <sup>1</sup>Clínica Médica FCM-UNICAMP; <sup>2</sup>Clínica Médica FCM-UFRGS; <sup>3</sup>Gastrocentro UNICAMP

**Objetivo:**

Padronizar e implantar uma técnica rápida e de grande sensibilidade para a detecção do patógeno *Helicobacter pylori*, a Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested, em amostras de biópsias gástricas obtidas através de exame endoscópico (biópsias a fresco). Determinar o genótipo de cepas de *H. pylori* utilizando enzimas de restrição específicas do fragmento do gene urease C amplificado pela PCR.

**Métodos e Resultados:**

Os métodos utilizados para a detecção do *H. pylori* nas amostras de biópsias gástricas dos pacientes portadores de úlcera e gastrite foram: extração de DNA das biópsias a fresco; confirmação da presença do DNA e de sua qualidade nas amostras pela reação de betaglobina; amplificação gênica pela Nested-PCR para detecção do *H. pylori*; amplificação gênica pela PCR para detecção da bactéria na região do gene urease C; finalmente, nas amostras positivas, digestão com enzimas de restrição específicas para o gene urease C.

Resultados preliminares foram obtidos utilizando-se 82 amostras de biópsias a fresco sabidamente positivas para *H. pylori* (teste da urease e/ou histologia); em 50 dessas amostras foi realizada a Nested PCR para detecção do *H. pylori*, obtendo-se 100% de concordância. No total de 82 amostras foi realizada a PCR para a região do gene urease C, também obtendo-se 100% de

concordância. A genotipagem foi realizada em 58 das 82 amostras amplificadas para a região do gene urease C, utilizando-se as enzimas de restrição Hha I e Mbo I.

**Conclusões:**

Os resultados demonstraram que a Nested PCR é uma técnica de grande reprodutibilidade, além de ser altamente sensível. A variação genética das linhagens de *H. pylori* está sendo analisada. Acreditamos que a genotipagem possa contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos patogênicos causados pelos vários padrões encontrados, dos quais os mais frequentes foram I-4, 20,7%, com a enzima Hha I e I-4, 23,3%, com a enzima Mbo I.

30.003

ANTIGENICIDADE DE FRAGMENTOS DE TRIPSINIZAÇÃO DE ANTÍGENO DE ALTA-MASSA MOLECULAR DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*. <sup>1</sup>Massuda, T. Y. C.; Ciências Patológicas UEL

**Objetivo:**

Considerando a importância da fração de hMM, o presente trabalho teve como objetivo obter fragmentos menores e verificar quais são reconhecidos pelo soro de paciente com PCM.

**Métodos e Resultados:**

A fração de hMM foi obtida por cromatografia em coluna de Sephadex G-200 de "cell free antigens" (CFA) de Pb18 e a seguir tripsinizada e re-fracionada por HPLC. Os eluatos coletados foram analisados a 280 nm e por "dot blotting" utilizando soros de pacientes com PCM. Os resultados preliminares obtidos demonstraram cerca de 15 picos de absorvância a 280 nm e 6 frações reativas por "dot blotting". Duas frações com massa molecular de aproximadamente 45kDa, duas frações acima e duas abaixo de 45 kDa.

**Conclusões:**

A caracterização futura dessas frações será importante para o estudo da patogenicidade na PCM experimental.

30.004

CO-INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV) COM O HERPESVÍRUS HUMANO TIPO 6 (HHV-6) EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE MEDULA ÓSSEA. <sup>1</sup>Parola, D. C.; <sup>1</sup>Bonon, S. H. A.; <sup>2</sup>Vigorito, A. C.; <sup>2</sup>Souza, C.A.; <sup>1</sup>Costa, S. C. B.; <sup>1</sup>Clínica Médica FCM-UNICAMP; <sup>2</sup>Hemocentro, UNICAMP

**Objetivo:**

Detectar o DNA do HHV-6 em pacientes com Infecção Ativa por HCMV após o transplante de medula óssea utilizando a N-PCR; determinar a interação entre estes vírus e verificar a possibilidade da co-infecção por HHV-6 ser possível fator de risco para doença por HCMV, avaliando o impacto clínico destas viroses neste grupo de pacientes.

**Métodos e Resultados:**

Foram estudadas retrospectivamente amostras de DNA extraídos de sangue periférico de 46 pacientes receptores de TMO, coletadas semanalmente desde o dia do transplante até 150 dias após o transplante. Todos estes pacientes apresentaram Infecção Ativa por HCMV detectada pela N-PCR. Como controle interno da reação, utilizamos primers para uma região do gene da beta-globina humana.

O DNA do HHV-6 foi detectado em 34/46 pacientes (73,9%). Utilizamos como critério para definição de infecção ativa pelo HHV-6, a presença de 2 ou mais resultados positivos consecutivos, o que ocorreu em 14/46 pacientes estudados (30,4%). A co-infecção ativa por estes dois herpesvírus ocorreu em 14/46 pacientes estudados (30,4%). A infecção ativa por HCMV apareceu em média 31,5 dias após o transplante. A infecção ativa por HHV-6 apareceu em média 39,5 dias após o transplante. Dos 46 pacientes com infecção ativa por HCMV positivos pela PCR, 3/46 (6,5%) desenvolveram doença por HCMV e apresentaram concomitantemente, infecção ativa pelo HHV-6.

**Conclusões:**

Diante dos resultados obtidos até o presente momento, podemos concluir que o HHV-6 é um possível fator de risco para o desenvolvimento da doença por HCMV neste grupo de pacientes.

30.005

DETECÇÃO MOLECULAR DE AGENTES RICKETTSIAIS EM ECTOPARASITOS. <sup>1</sup>Oliveira, K. A. <sup>\*\*</sup>; <sup>1</sup>Dias, C. C. A. <sup>\*</sup>; <sup>1</sup>Oliveira, L. S. <sup>\*</sup>; <sup>1</sup>Motta, C. C.; <sup>2</sup>Galvão, M. A. M.; <sup>1</sup>Lamêgo, M. R. A.; <sup>1</sup>Mafra, C. L. <sup>1</sup>Bioquímica e Biologia Molecular, UFVigosa; <sup>2</sup>Nutrição Clínica UFOP

**Objetivo:**

As rickettsioses constituem um grupo de doenças causadas por parasitas intracelulares obrigatórios da Ordem *Rickettsiales*. A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é a doença rickettsial mais prevalente e recentemente foi relatado os três primeiros casos de ehrlichiose humana no Brasil. Aplicação de técnicas moleculares, destacando PCR, oferece um ensaio sensível e específico para detecção de rickettsia e ehrlichia. Assim, este trabalho teve como objetivo a detecção molecular destes agentes gerando suporte para ações voltadas à vigilância epidemiológica.

**Métodos e Resultados:**

Coletou-se 504 carrapatos dos gêneros *Amblyoma* e *Rhipicephalus* de animais domésticos (cães e equinos) em Nova Venécia (ES), uma área endêmica para FMB. No laboratório, os ectoparasitos foram divididos em 150 *pools* de acordo com o animal de origem. Para extração do DNA utilizou-se o método de centrifugação-proteinase K. Para detecção de ehrlichia foi utilizado um par de primers que amplificam uma sequência de 478pb Ehrlichia gênero-específico do gene rRNA 16S. Para detecção de rickettsia utilizou-se um par de primers externos que amplificam uma sequência de 434pb do gene da proteína de 17kDa Rickettsia gênero-específica, e para Nested-PCR, um par de primers internos, que amplificam um fragmento de 232pb da mesma proteína e 2µL da primeira reação de PCR. Foi encontrada uma taxa de 13,33% (20/150) de *pools* infectados com *rickettsia sp.* e 2% (3/150) com *Ehrlichia sp.*

**Conclusões:**

Com a detecção molecular destes agentes realizar-se-á o sequenciamento dos fragmentos amplificados para identificação e análise filogenética das espécies de *Rickettsia* e *Ehrlichia* na referida área, possibilitando um estudo sobre as interações ecológicas entre estas espécies, seus vetores artrópodes e hospedeiros domésticos e silvestres envolvidos na manutenção dos ciclos das rickettsioses. **Apoio: Capes**

30.006

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS) IN THE TNF $\alpha$  GENE PROMOTER IN SEPTIC PEDIATRIC PATIENTS. <sup>1</sup> Matos, G. I.; <sup>2</sup>Azevedo, Z. M. A.; <sup>2</sup>Luz, R. A.; <sup>2</sup>Sales, S. C. M. <sup>\*\*</sup>; <sup>3</sup>Vanderborght, P. R.; <sup>2</sup>Araújo, C.; <sup>7</sup> Elsas, P. P. X.; <sup>2</sup>Gaspar Elsas, M. I.; <sup>3</sup>Sampaio, E. P.; <sup>4</sup>Moraes, M. O. <sup>1</sup>Pediatria FIOCRUZ; <sup>2</sup>Pediatria, FIOCRUZ / Instituto Fernandes Figueira; <sup>3</sup>Hanseníase IOC-FIOCRUZ; <sup>4</sup>Imunologia UFRJ

**Introduction:**

Point mutations are correlated with the heterogeneity of clinical manifestations and sepsis severity. These mutations called single-nucleotide polymorphisms (SNPs) may be associated with immunomodulatory cytokines expression. TNF $\alpha$  gene is described to have important SNPs among which are the -308 (G→A) and -863 (C→A) that are associated with TNF $\alpha$  expression. It is assumed that patients with an enhanced TNF $\alpha$  production determined genetically are prone to have a worse prognosis with a greater risk for development of multiple organs and systems failure (MOF) and death following sepsis.

**Objectives:**

To evaluate TNF- $\alpha$  gene polymorphisms at -308 and -863 positions in pediatric patients at the Critical Care Unity of the Fernandes Figueira Institute.

**Methods:**

We evaluated 33 male and female patients with age varying between 0 and 12 years presenting clinical manifestations of sepsis associated with different degrees of respiratory insufficiency. Total DNA was extracted from blood samples and molecular genotyping was carried out using PCR-RFLP and PCR-ARMS to evaluate mutations at -308 and -863 respectively. For data analysis we determined allelic and genotypic frequencies as well as the evaluation of the Hardy-Weinberg equilibrium to all samples studied.

**Results:**

Genotypic frequencies found were GG (0.73) and GA (0.27) for -308 mutations; and CC (0.81), CA (0.16) and AA (0.03) for -863 mutations. Allelic frequencies found were G (0.86) and A (0.14) for -308; and C (0.89) and A (0.11) for -863. The population studied is within the Hardy-Weinberg

equilibrium for both polymorphisms. The frequencies found corresponded to those found worldwide by others within different populations of septic patients.

#### Conclusões:

This preliminary study can be the basis for a future association between TNF- $\alpha$  promoter polymorphisms and sepsis clinical outcome.

30.007

DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO MÉTODO PARA DETERMINAR CORTICOSTERÓIDES (CORS) EM AMOSTRAS SANGÜÍNEAS DE ANIMAIS SUBMETIDOS AO ESTRESSE AGUDO EMPREGANDO COLUNA CROMATOGRÁFICA ISRP E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE). <sup>1</sup>Toledo-Pinto, E. A.; <sup>2</sup>Menezes, M. L.; <sup>3</sup>Pereira, O. C. M.; <sup>1</sup>Química UNESP-Araraquara; <sup>2</sup>Química, UNESP-Bauru; <sup>3</sup>Farmacologia UNESP-Botucatu

#### Objetivo:

Radioimunoensaio e ensaios com ligantes protéicos são usados como métodos para dosagem de CORS, embora muito sensíveis, não possuem alta especificidade, sendo cruciais em fluidos biológicos. Isto conduziu à separação por CLAE juntamente com o desenvolvimento de fases estacionárias. A fase ISRP (superfície interna de fase reversa) foi desenvolvida com a finalidade de analisar diretamente amostras de plasma e soro sem remoção prévia de proteínas. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo método analítico sensível, rápido e simples para determinar CORS em amostras sangüíneas de animais submetidos ao estresse agudo.

#### Métodos e Resultados:

Efetuu-se a imobilização de albumina de soro humano numa coluna C<sub>18</sub> (100 x 4,6 mm DI). Fase móvel foi composta por tampão fosfato (pH=4): acetonitrila (65:35 v/v), detector ultravioleta a 240 nm, integrador SP4400 Chromaject-Varian e loop de 100  $\mu$ L. Os parâmetros cromatográficos da coluna foram obtidos empregando um cromatograma após a injeção da solução padrão - 0,60  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de CORS (Tabela). Os animais submetidos a uma única sessão de estresse (natação e imobilização) por 5, 15, 30 e 50 min foram decapitados e as amostras sangüíneas retiradas do tronco encefálico p/ a determinação de CORS.

	Tempo retenção	nº pratos teóricos	Resolução	Seletividade	Fator de capacidade	Assimetria de pico
C	3,2	1401	-	1,8	2,8	1
CT	5,0	880	4,1	1,5	5,1	1
AH	7,3	1178	5,0	1,8	7,8	1
AD	12,5	863	9,4	-	14,0	1

A recuperação dos CORS foi 101, 103, 100 e 103% p/ cortisona (C), corticosterona (CT), acetatos de hidrocortisona (AH) e dexametasona (AD), respectivamente (n=5). Os limites de detecção e quantificação foram 0,02 e 0,04  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

#### Conclusões:

O novo método analítico proposto para determinar CORS em amostras sangüíneas demonstrou ser simples, rápido, preciso e eficiente.

30.008

DETERMINAÇÃO DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA EM RATOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE AGUDO INDUZIDO POR IMOBILIZAÇÃO FORÇADA. <sup>1</sup>Toledo-Pinto, E. A.; <sup>2</sup>Menezes, M. L.; <sup>3</sup>Pereira, O. C. M. <sup>1</sup>Química UNESP-Araraquara; <sup>2</sup>Química UNESP-Bauru; <sup>3</sup>Farmacologia UNESP-Botucatu

#### Objetivo:

O hormônio corticosterona (CORTs) é o maior e o mais abundante glicocorticóide secretado pelo córtex adrenal em roedores. Esse hormônio além de ser um indicador essencial de estresse, possui uma ampla atividade; é efetivo na manutenção da pressão sangüínea, está envolvido na gliconeogênese, na absorção de cálcio e na secreção de ácido gástrico, regula o metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras e atua em menor grau, no metabolismo hídrolítico. Funções semelhantes são exercidas pelo cortisol em seres humanos. Determinações de corticosteróides são de grande interesse para a farmacologia aplicada, química analítica e análises clínicas uma vez que pode auxiliar e conduzir diversas pesquisas no campo de análise de hormônios esteróidicos, e principalmente no controle e monitoramento destes hormônios nos diagnósticos de diversas patologias relacionadas ao estresse. Desta forma, torna-se relevante à determinação de CORTs em

ratos submetidos ao estresse agudo induzido por imobilização forçada (EI), empregando a injeção direta da amostra em uma coluna cromatográfica ISRP e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

**Métodos e Resultados:**

Os animais foram submetidos a uma única sessão de EI durante 5, 15, 30 e 50 minutos, em seguida decapitados e as amostras sanguíneas foram retiradas do tronco encefálico.

A **tabela** mostra os CORTs ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) nos grupos experimentais.

Grupos	Controle	EI 5'	EI 15'	EI 30'	EI 50'
CORTs	$0,40 \pm 0,06$	$1,85 \pm 0,41$	$2,27 \pm 0,53$	$0,96 \pm 0,18$	$1,26 \pm 0,21$

**Conclusões:**

Os níveis de CORTs aumentaram significativamente dentro de poucos minutos (5' e 15') após a sessão de EI, indicando que o componente emocional instalou-se rapidamente nos animais devido à situação de alerta, onde há liberação de adrenalina e glicocorticóides. Houve uma redução drástica de CORTs aos 30' e 50' direcionando a adaptação dos animais ao estresse imposto.