

Inovação tecnológica na saúde

A semi-transparent map of South America is positioned in the upper right corner of the page, overlapping the title text.The background of the entire page is a composite image. On the left, there is a laboratory setup with a round-bottom flask on a stand, a larger Erlenmeyer flask containing a blue liquid, and two smaller flasks at the bottom. On the right, a microscope is visible. The background is a mix of purple and pink tones with a faint, glowing circuit board pattern overlaid.

Edição 2012 do
Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia

Inovação tecnológica na saúde



**Edição 2012 do
Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia**

Brasília, novembro de 2012

Esclarecimento

A UNESCO mantém, no cerne de suas prioridades, a promoção da igualdade de gênero, em todas as suas atividades e ações. Devido à especificidade da língua portuguesa, adotam-se, nesta publicação, os termos no gênero masculino, para facilitar a leitura, considerando as inúmeras menções ao longo do texto. Assim, embora alguns termos sejam grafados no masculino, eles referem-se igualmente ao gênero feminino. Por exemplo, quando se menciona *professor*, subentende-se também estar incluída a ideia de *professora*.

Os autores são responsáveis pela escolha e pela apresentação dos fatos contidos neste livro, bem como pelas opiniões nele expressas, que não são necessariamente as da UNESCO, nem comprometem a Organização. As indicações de nomes e a apresentação do material ao longo deste livro não implicam a manifestação de qualquer opinião por parte da UNESCO a respeito da condição jurídica de qualquer país, território, cidade, região ou de suas autoridades, nem tampouco a delimitação de suas fronteiras ou limites.

“Los autores se responsabilizan de la selección y presentación de los datos contenidos en esta publicación, y de las opiniones que en ella se expresan, que no necesariamente coinciden con las de la UNESCO ni comprometen a la Organización. Las denominaciones empleadas en esta publicación y la presentación de los datos que figuran en ella no suponen la expresión de opinión alguna por parte de la UNESCO sobre la condición jurídica de países, territorios, ciudades o zonas, ni sobre sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras o límites.”

Inovação tecnológica na saúde



PATROCÍNIO PATROCINIO

Ministério da
**Ciência, Tecnologia
e Inovação**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA

APOIO APOYO



Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
Ciência, Tecnologia e Inovação

ORGANIZAÇÃO ORGANIZACIÓN



Representação
no Brasil

RECyT



Ministerio de
Ciencia, Tecnología
e Innovación Productiva
Presidencia de la Nación



Gobierno Bolivariano
de Venezuela
Ministerio del Poder Popular
para Ciencia, Tecnología e
Industrias Intermedias



© 2012 UNESCO.
Todos os direitos reservados.

Revisão (português): B&C Textos

Revisão (espanhol): Fernando Campos Leza

Projeto gráfico e capa: Unidade de Comunicação Visual da Representação da UNESCO no Brasil

Fotos do capítulo “Participación de células pluripotentes de médula ósea en el proceso de degeneración-regeneración nerviosa”: Lidia Margarita Lopez

Inovação tecnológica na saúde: edição 2012 do Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia.
– Brasília: UNESCO, RECyT/ MERCOSUL, MCTI, CNPq, MBC, CGEE, 2011.
208 p.

ISBN: 978-85-7652-173-0

1. Tecnologia 2. Saúde 3. MERCOSUL. 4. América Latina I. UNESCO II. Reunião Especializada de Ciência e Tecnologia III. Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação IV. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico V. Movimento Brasil Competitivo VI. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos



Organização
das Nações Unidas
para a Educação,
a Ciência e a Cultura

Representação no Brasil

SAUS, Quadra 5 Bloco H, Lote 6, Ed.
CNPq/IBICT/UNESCO, 9º andar
70070-912 - Brasília - DF - Brasil
Tel.: (55 61) 2106-3500
Fax: (55 61) 2106-3697
E-mail: grupoeditorial@unesco.org.br
www.unesco.org/brasilia
www.facebook.com/unesconarede
www.twitter.com/unescobrasil

Agradecimentos

À Comissão de Avaliação dos trabalhos concorrentes ao Prêmio, constituída de representantes indicados pelas coordenações da Reunião Especializada de Ciência e Tecnologia (RECyT) dos países-membros do MERCOSUL, que esteve reunida no escritório da UNESCO, em Brasília, nos dias 17 e 18 de setembro de 2012 para analisar e selecionar os trabalhos premiados em quatro categorias.

Ao grupo técnico constituído por especialistas pertencentes às instituições organizadoras e patrocinadoras do Prêmio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil), ao Movimento Brasil Competitivo (MBC/Brasil), ao Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE/Brasil), ao Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação Produtiva da Argentina, ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia do Paraguai, ao Ministério de Educação e Cultura do Uruguai, ao Observatório Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação da Venezuela, parceiros na organização e execução desse Prêmio; ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil (MCTI/Brasil), patrocinador do Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia de 2012.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse Prêmio.

Comissão de avaliação:

Professor Ary Mergulhão Filho, presidente da Comissão, UNESCO/Brasil

Professor Carlos Alberto Fossati, representante da RECyT/Argentina

Professor Dácio Eduardo Leandro Campos, representante da RECyT/Brasil

Professor Edson Zangrando Figueira, representante da RECyT/Brasil

Professor Kleber Franchini, representante da RECyT/Brasil

Professor Eduardo Osinaga, representante da RECyT/Uruguai

Grupo técnico da comissão de avaliação:

Alessandra Monteiro Porn

Movimento Brasil Competitivo

Eliana Cardoso Emediato de Azambuja

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação no Brasil

Juliana Proite

UNESCO/Brasil

Rafaela Marques

UNESCO/Brasil

Rita de Cássia da Silva

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico no Brasil

Rubens Martins

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação no Brasil

Sumário

Abstract.....09

Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia – Edição 201211

TRABALHOS PREMIADOS

Categoria Iniciação Científica

Desplazamiento simple y bioadsorción de plomo II en las aguas del río Rímac mediante cáscara de huevo y pepa de aceituna.....15

Categoria Estudante Universitário

Acilpoliaminas do veneno da aranha brasileira *Nephilengys cruentata*: antigos neuromoduladores como uma nova alternativa no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos37

Categoria Jovem Pesquisador

Vacinação com vírus influenza e adenovírus recombinantes é capaz de promover potente resposta imunológica e proteção contra doença de Chagas61

Categoria Integração

Mal de Chagas, una enfermedad presente pero olvidada. Estudios *in-vitro/ in-vivo* de nuevas formulaciones sólidas y líquidas de Benznidazol87

TRABALHOS AGRACIADOS COM MENÇÃO HONROSA

Categoria Iniciação Científica

MosquiFAIL: modo prático e
de baixo custo para extermínio do *Aedes aegypti*115

Categoria Estudante Universitário

A Biologia Sintética para a produção de um biofármaco para hemofilia A ...127

Categoria Jovem Pesquisador

Participación de células pluripotentes de
médula ósea en el proceso de degeneración-regeneración nerviosa.....143

Categoria Integração

Sistema de realidade aumentada para uso na reabilitação
motora de membro superior de indivíduos acometidos
por acidente vascular encefálico177

Nota sobre os autores.....197

Nota sobre os membros da comissão de avaliação205

Abstract

The MERCOSUR Award for Science and Technology was established in 1998 by the Science and Technology Specialized Meeting – RECyT/MERCOSUR. In its ninth edition, the call for submissions was launched on April 9, 2012, by a partnership including the United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), the Brazilian Competitive Movement (MBC), the Center for Strategic Studies and Management in Science, Technology and Innovation (CGEE/Brazil) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil). It is sponsored by the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI). The goal of the Award is to recognize and reward the best research works that represent potential contributions to the scientific and technological development of MERCOSUR countries. It also provides incentives for scientific and technological research to be carried out, directed at the regional integration process among the countries in the block. In 2012, *Technological innovation in health* was chosen as theme and divided into four categories: *Scientific Initiation* for students of Upper Secondary Education up to 21 years of age, *University Student* for Higher Education undergraduates with no age limit, *Young Researcher* for graduate scholars of up to 35 years of age and *Integration* for teams that have graduates, with no age limit, and involving at least two different countries. This book presents, including all four categories, Award winners and works that received Honours.

Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia – Chamada 2012

Inovação tecnológica na saúde

O avanço científico e tecnológico é um fator especial de promoção do bem-estar da humanidade. Ele deve fazer parte de ações destinadas a engrandecer e respeitar a dignidade das pessoas. A incorporação dos progressos da ciência e da tecnologia à vida cotidiana deve contribuir diretamente para a melhoria das condições de vida da população.

Alinhado a esse pensamento, o Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia, em sua versão de 2012, definiu como temática a aplicação da tecnologia para a melhoria do atendimento às pessoas. O tema deste ano é “Inovação tecnológica na saúde”, entendendo-se como *inovação* a melhoria significativa de produtos ou processos, nesse caso, aplicados ao setor da saúde.

Foram considerados trabalhos de “Inovação tecnológica na saúde” aqueles relacionados com prevenção, tratamento, desenvolvimento de vacinas, diagnósticos, medidas sanitárias e novas tecnologias biomédicas e farmacêuticas para enfermidades relevantes para a região. As seguintes linhas de pesquisa foram consideradas elegíveis:

- doenças de caráter infeccioso, como dengue, leishmaniose, doença de Chagas (tripanossomíase americana – *Trypanosoma cruzi*), encefalites (vírus do Nilo e vírus de São Luís) etc.;
- doenças endêmicas agudas e crônicas, como dengue, febre amarela, brucelose, hidatidoses etc.;
- doenças crônico-degenerativas e imunológicas, como mal de Alzheimer etc.;
- doenças neurológicas, como distúrbios do movimento, cefaleias, epilepsias etc.;
- doenças crônicas não transmissíveis, como hipertensão, infartos, acidentes cerebrovasculares, diabetes, câncer, doenças respiratórias crônicas etc.

O Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia foi idealizado para promover a cooperação técnico-científica em temas de interesse da região, entre os países do bloco e associados: Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela. Nesta edição, foram convidados a apresentar trabalhos estudantes e professores do ensino médio, estudantes universitários, jovens pesquisadores e equipes de pesquisa de dez países. Essa iniciativa visa a contribuir para o desenvolvimento mais homogêneo dos países envolvidos e para a melhoria da qualidade de vida de suas populações.

São apresentados, a seguir, os trabalhos premiados nas quatro categorias.

Categoria Iniciação Científica – 1º lugar

Trabalho: “Desplazamiento simple y bioadsorción de plomo II en las aguas del río Rímac mediante cáscara de huevo y pepa de aceituna”

Autora: Kathya Linette Mimbela Barrera, 16 anos, estudante do 4º ano de educação secundária no Colégio San Roque

Professor-orientador: Luis Ernesto Mimbela Quispe, Colégio San Roque

País: Peru

Categoria Estudante Universitário – 1º lugar

Trabalho: “Acilpoliaminas do veneno da aranha brasileira *Nephilengys cruentata*: antigos neuromoduladores como uma nova alternativa no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos”

Autor: Ivan Lavander Candido Ferreira, 21 anos, estudante do 6º semestre de ciências biológicas na Universidade de São Paulo (USP)

Professor-orientador: Pedro Ismael da Silva Junior, Instituto Butantan

País: Brasil

Categoria Jovem Pesquisador – 1º lugar

Trabalho: “Vacinação com vírus influenza e adenovírus recombinantes é capaz de promover potente resposta imunológica e proteção contra doença de Chagas”

Autor: Rafael Polidoro Alves Barbosa, 27 anos, doutorando em bioquímica e imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

País: Brasil

Categoria Integração – 1º lugar

Trabalho: “Mal de Chagas, una enfermedad presente pero olvidada. Estudios *in vitro/in vivo* de nuevas formulaciones sólidas y líquidas de Benznidazol”

Autores:

Claudio Javier Salomon, 49 anos, argentino, com pós-doutorado

Darío Leonardi, 38 anos, argentino, com pós-doutorado

Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho, 31 anos, brasileiro, com pós-doutorado

María Celina Lamas, 44 anos, argentina, com pós-doutorado

Livia Cristina Lira de Sá Barreto, 33 anos, brasileira, com pós-doutorado

Países: Argentina e Brasil

Categoria Iniciação Científica – Menção honrosa

Trabalho: “MosquiFAIL: modo prático e de baixo custo para extermínio do *Aedes aegypti*”

Autor: David Richer Araujo Coelho, 16 anos, estudante da 2ª série do ensino médio no Colégio Municipal Francisco Porto de Aguiar

País: Brasil

Categoria Estudante Universitário – Menção honrosa

Trabalho: “A Biologia Sintética para a produção de um biofármaco para hemofilia A”

Autor: Angelo Luis Caron, 23 anos, estudante do 8º semestre de ciências biológicas pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP)

Professora-orientadora: Aparecida Maria Fontes, Hemocentro de Ribeirão Preto (FMRP/USP)

País: Brasil

Categoria Jovem Pesquisador – Menção honrosa

Trabalho: “Participación de células pluripotentes de médula ósea en el proceso de degeneración-regeneración nerviosa”

Autora: Vanina Usach, 31 anos, doutoranda em neurociências na Universidade de Buenos Aires (UBA)

País: Argentina

Categoria Integração – Menção honrosa

Trabalho: “Sistema de realidade aumentada para uso na reabilitação motora de membro superior de indivíduos acometidos por acidente vascular encefálico”

Autores:

Gilda Aparecida de Assis, 39 anos, brasileira, com doutorado completo

Roseli de Deus Lopes, 48 anos, brasileira, com doutorado completo

Maria Bernardete Rodrigues Martins, 53 anos, brasileira, com mestrado completo

Eloy Vicente de la Barra Velasquez, 44 anos, boliviano, com mestrado em curso

Sílvia Lemos Fagundes, 45 anos, brasileira, com mestrado completo

Alexandre Leuckert Klein, 25 anos, brasileiro, com ensino superior completo

Países: Bolívia e Brasil

Categoria Iniciação Científica

1º Lugar

DESPLAZAMIENTO SIMPLE Y BIOADSORCIÓN
DE PLOMO II EN LAS AGUAS DEL RÍO RÍMAC
MEDIANTE CÁSCARA DE HUEVO Y PEPA
DE ACEITUNA

Autora: Kathya Linette Mimbela Barrera, 16 anos, estudante do 4º ano de educação secundária no Colégio San Roque

Professor-orientador: Luis Ernesto Mimbela Quispe,
Colégio San Roque

País: Peru

Desplazamiento simple y bioadsorción de plomo II en las aguas del río Rímac mediante cáscara de huevo y pepa de aceituna

1. Resumen

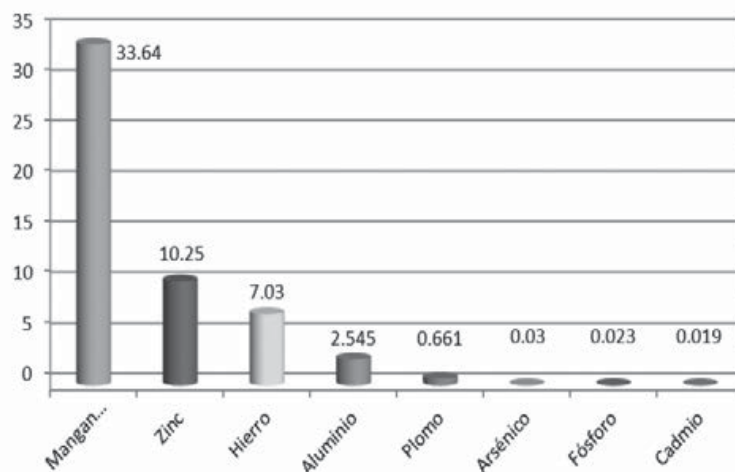
El río Rímac nace en la laguna Ticticocha, a 4700 m.s.n.m., y cinco kilómetros aguas abajo se une un río Chinchán, donde el río Rímac comienza a discurrir por el departamento de Lima, en el Perú. Sus afluentes están plagados de metales pesados, entre ellos el Pb (II), que causa anomalías irreversibles a organismos vivos (seres humanos, animales y plantas) cuando supera los niveles de calidad ambiental definidos para el agua en miligramos por litro. Nuestro proyecto tiene como fin solucionar la sedimentación y adsorción de Pb (II) en el agua proveniente de este río, que abastece a Lima capital, por una técnica combinada de desplazamiento simple del Ca^{+2} en el carbonato de calcio pulverizado de la cáscara de huevo con el Pb (II) suspendido en una solución de agua, y la adsorción de la pepa de aceituna, donde el ion carboxilo presente en la pepa de aceituna permite la adsorción del Pb (II), dejando un agua limpia de este metal pesado en suspensión. La combinación de 75 % de pepas de aceituna (ion carboxilo) y 25 % de cáscara pulverizada de huevo (carbonato de calcio) nos han permitido crear un negocio, produciendo un biocombustible el cual aminora hasta el 80 % de emisión de CO_2 al ambiente, pudiendo ser utilizado en parrillas para barbacoa y como biocombustible para calefactores y en provincias como reemplazo a la leña y al carbón para cocinar. La pepa o hueso de aceituna, al igual que las cáscaras de huevo, son desechadas, por lo que nosotros las utilizamos para la adsorción de Pb (II) en el agua y también para producir un biocombustible barato como alternativa para solucionar la contaminación ambiental por emisión de CO_2 . Este proyecto ocupó el Primer Lugar a Nivel de la Región de Lima Metropolitana en la Categoría Investigación Científica 2011 – Feria Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú.

2. Presentación

2.1. Problema

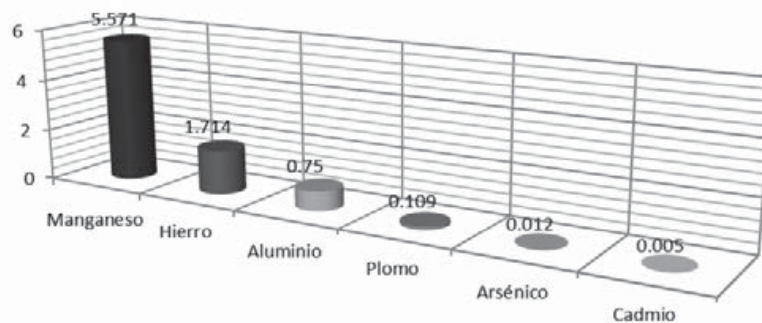
El río Rímac abastece a muchas comunidades, desde la laguna Ticticocha, a 4700 m.s.n.m., donde se encuentra la minera Volcán, y los Campamentos de la minera Casapalca, a 4193 m.s.n.m., y a lo largo de toda la Carretera Central, pasando la minera Los Quenuales. El 77% del agua que bebe Lima viene del Rímac, pero empresas, municipios y familias arrojan allí sus desechos sin pudor: cada segundo el caudal recibe 3189 litros de desagües y residuos industriales, según el Ministerio del Ambiente (MINAM). El 13 de junio de 2011, el diario *El Comercio*¹, realizó un informe exhaustivo sobre los niveles de metales pesados y otros residuos industriales que acababan con el río Rímac. Los estudios estuvieron a cargo de Flor de María Huamaní, ingeniera y autoridad nacional del Agua. En resumen, una exposición continua al plomo, incluso a niveles bajos, puede causar anemia y lesiones en el sistema nervioso, con secuelas irreversibles. El informe muestra los siguientes resultados. Valor permitido de plomo en Agua: 0,05 mg/L para aguas de riesgo de vegetal, consumo crudo y consumida por animales (Ley General de Aguas).

Minerales que superan los estándares de Calidad para Agua en la Quebrada Antaranra

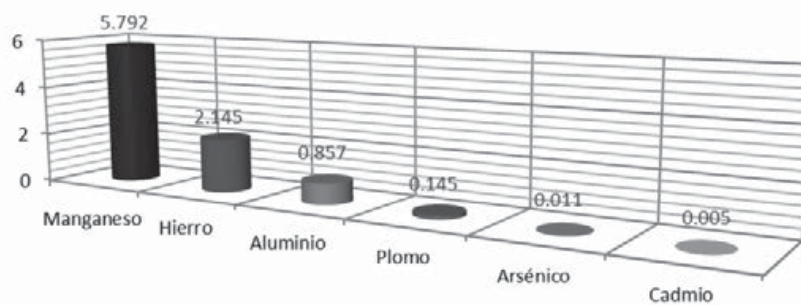


1. RAMÓN, R. La minería es la primera actividad en contaminar el Río Rímac. *El Comercio*, 13 jun. 2011. Disponible en: <<http://elcomercio.pe/planeta/780318/noticia-mineria-primer-actividadcontaminar-rio-rimac>>

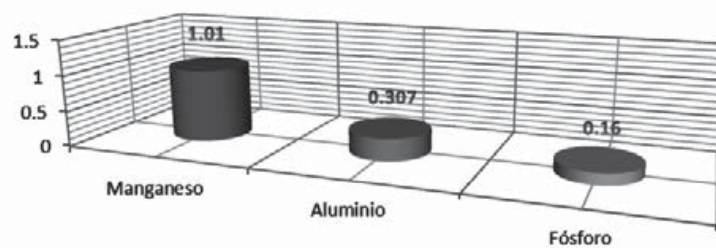
Minerales que superan los Límites de Calidad Ambiental para Agua antes del efluente de la Minera Casapalca



Minerales que superan los Estándares de Calidad Ambiental para Agua a unos 400 metros luego del afluente de la minera Casapalca



Minerales que superan los Estándares de Calidad Ambiental para Agua a unos 10 metros antes del Túnel Grathon en Los Quenuales



Minerales que superan los Estándares de Calidad Ambiental para Agua un kilómetro después del efluente del Túnel Grathon de Los Quenuales

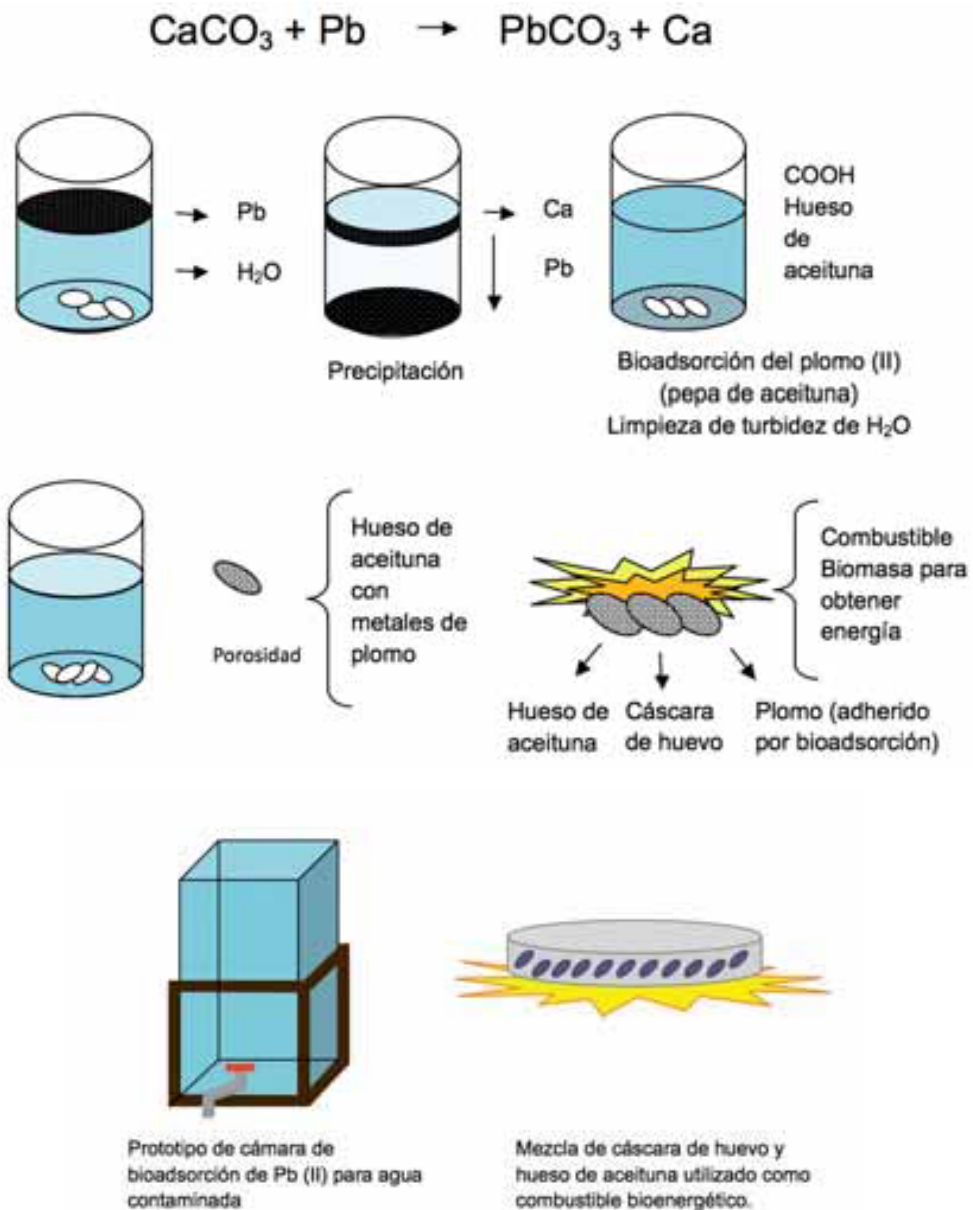


2.2. Justificación

Aunque estamos trabajando en la contaminación de las aguas por metales pesados de plomo, desde Ticticocha hasta Lima, esta cuestión no es solo de interés local, sino nacional. Hay que recordar que el río Mantaro, llamado Hatunmayo, nace contaminado, desde el lago de Junín, Chinchaycocha o de Los Reyes, a 4081 m.s.n.m. Y en La Oroya se vierten al río tóxicos líquidos a 37 afluentes, de los que solo se monitorean doce, y se liberan al aire 2500 toneladas de plomo y 2500 toneladas de arsénico diariamente. Con ello, La Oroya es la quinta ciudad más contaminada del mundo, siendo la primera Chernóbil, en Ucrania. El impacto ambiental de estas aguas en la agricultura, en la ganadería y en la salud es alarmante. Si bien es cierto se han utilizado técnicas convencionales para solucionar estos problemas de contaminación de aguas por metales pesados, el factor económico ha dejado sin efecto todos los esfuerzos. Nuestro proyecto de desplazamiento simple y bioadsorción de plomo cobra una importancia de interés nacional por su eficacia y su bajísimo costo de recolección, ya que los insumos son de desechos orgánicos.

2.3. Fundamentación

Desplazamiento simple y bioadsorción de plomo del agua



2.4. Objetivos

- a) Disminuir las altas concentraciones de plomo en las aguas del río Rímac, que abastece de agua a todas las comunidades desde la laguna Ticticocha hasta la Carretera Central en Lima.
- b) Combinar dos técnicas con insumos de desecho orgánico (cáscara de huevo y pepa de aceituna) que permiten mantener un proceso autogenerado de limpieza de agua permanente a un bajo costo económico.

- c) Eliminar los altos índices de enfermedades provocadas por la contaminación de plomo en agua en niños, jóvenes y adultos, tales como el irreversible desarrollo mental en los niños, la anemia crónica, el deterioro del sistema nervioso, enfermedades renales por exposición al plomo y malformaciones en las células sanguíneas.

Desarrollo metodológico del desplazamiento simple y la bioadsorción del plomo (técnica *in vitro*)

1. Material orgánico

Pepa de aceituna
Cáscara de huevo

2. Material para la colecta de agua del río Rímac

Balde de plástico, cinco litros
Una soguilla gruesa
Un embudo de plástico
Un esparadrapo grueso blanco
Un plumón indeleble
Una caja de cintas para pH
Reactivo preservante del H₂O (HNO₃), estabilizador

3. Material para las pruebas de bioadsorción

Gradillas de diez tubos
Tubos de ensayo 15×75
Vaso de precipitado de 250 ml-500 ml
Pipetas de 5 ml-10 ml
Propipetas
Pinzas de metal
Pipetas de transferencia
Cuaderno cuadriculado (cuaderno de campo)
Pilas (Pb en trabajo *in vitro*)
Reactivos de control (*Personal test*), medición de metales pesados en agua
Pinzas de metal

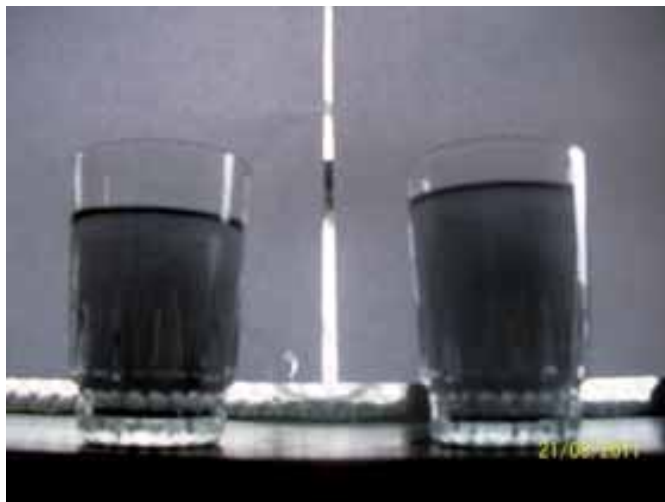
3. Desarrollo metodológico

- a) En un vaso de precipitado de 250 ml colocamos 6 gramos de plomo diluido con agua; con la ayuda de una bagueta de vidrio homogenizamos la muestra, observando un anillo o menisco en la superficie del vaso de precipitado, que es plomo en suspensión.
- b) La turbidez de la solución se debe al plomo en suspensión.
- c) Pulverizamos la cáscara de huevo, con la ayuda de un mortero y lo colocamos en bolsas de polipropileno y lo conservamos a seis grados centígrados en una nevera.
- d) Limpiamos y recolectamos pepas de aceituna, que dejaremos secar. Agregamos el molido de la cáscara de huevo en la superficie de la capa de plomo del agua, la cual sufrirá un desplazamiento simple.
- e) $\text{CaCO}_3 + \text{Pb} \rightarrow \text{PbCO}_3 + \text{Ca}$
- f) El plomo se precipita en forma de carbonato plúmbico, dejando al calcio en suspensión.
- g) Agregamos tres a cuatro pepas de aceituna, que realizará la bioadsorción por su radical $-\text{COOH}$ o radical carboxilo, característico de los ácidos orgánicos, que permitirá la precipitación del ion calcio y partículas de plomo que no han sido precipitadas.
- h) Se decanta el agua clarificada por la precipitación y bioadsorción de Pb (II) en agua.

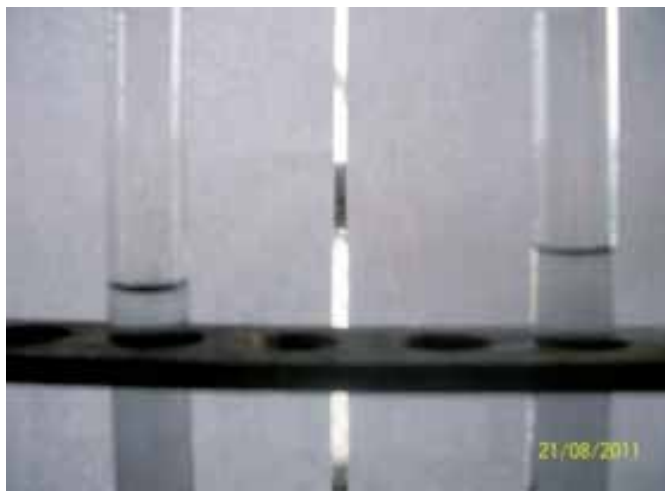
Técnica *in vitro* – Mezcla de agua del río Rímac con seis gramos de plomo.



Se observan los anillos de plomo (negro) en suspensión y la turbidez con metales



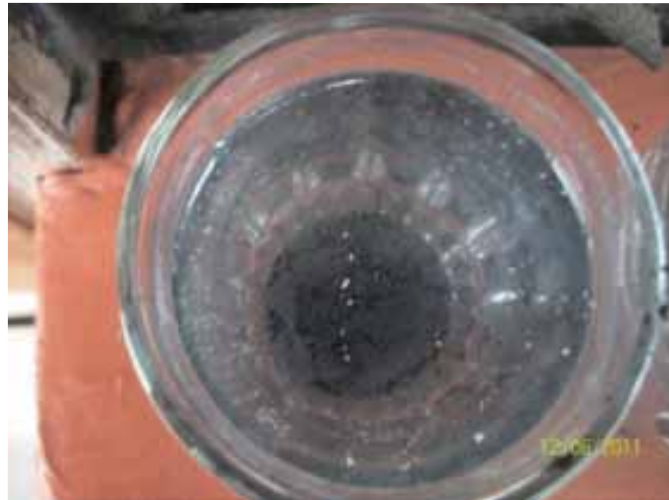
Anillos de plomo en la superficie y turbidez de arsénico y metales pesados.



Se agregó cáscara molida de huevo y se precipitó el plomo por el calcio.



Desaparición de la cubierta de plomo por el ion calcio (desplazamiento simple)



Al agregar el ion carboxilo de la pepa de aceituna se realiza la bioadsorción del plomo



Agua sin plomo, lista para decantar y ser utilizada



Prototipo de cámara de bioadsorción de plomo del agua



NOMBRE: CLUB DE CIENCIAS

MUESTRA N° 01: Agua mezclada con Plomo -

MUESTRA N° 02: Agua Procesada con Carbonato de Calcio y Hueso de Aceituna

ESTUDIO SOLICITADO: ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PLOMO EN AGUA POR FOTOCOLORIMETRÍA

<u>Estudio N° 01</u>		
<u>ESTUDIO</u>	<u>VALOR OBTENIDO</u>	<u>VALOR REFERENCIAL</u>
Plomo	0.32 mg/L	0.05 mg/L

<u>Estudio N° 02</u>		
<u>ESTUDIO</u>	<u>VALOR OBTENIDO</u>	<u>VALOR REFERENCIAL</u>
Plomo	0.04 mg/L	0.05 mg/L

Juan López Ricra
Lab. Clínico—Patología
CTMP 1371

Econegocio

El hueso de aceituna mezclado con la cáscara molida de huevo nos sirve como energético de biomasa combustible. Mientras que un galón de gasoil en Europa cuesta 6 euros, el hueso de aceituna mezclado con la cáscara no tiene valor comercial, y es una mezcla que puede usarse, por ejemplo, en las parrillas en lugar de carbón activado, carbón vegetal o gas propano. La mezcla de cáscara de huevo y hueso de aceituna es un excelente combustible natural.

Mezcla de cáscara de huevo molida y hueso de aceituna como combustible bioenergético (el más económico del mundo)

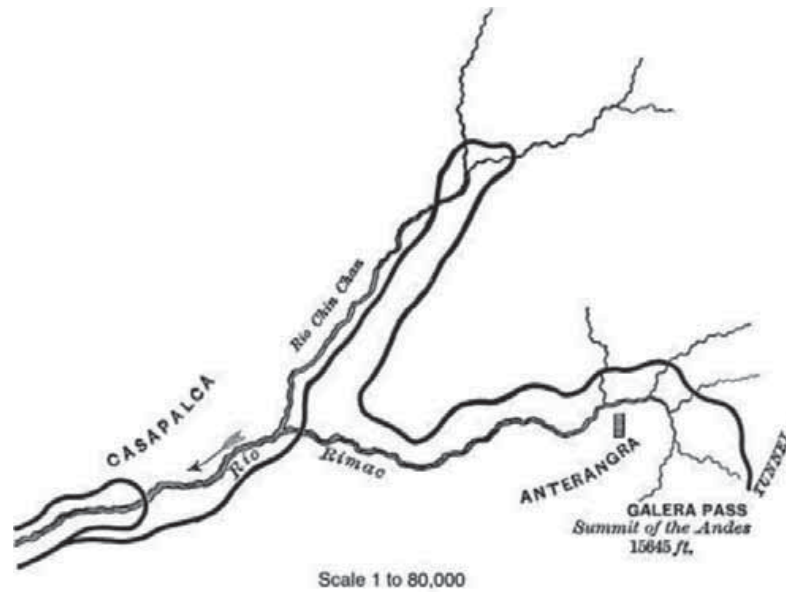


Bolsas de hueso de aceituna y cáscara de huevo para biomasa energética o para el tratamiento de aguas con contaminación de plomo (II)



Insumos por unidad	Costo por unidad
Pepas de aceituna	S/. 1,00
Cáscara de huevo	S/. 0,05
Etiqueta (publicidad)	S/. 0,50
Bolsa de polipropileno	S/. 0,04
TOTAL	S/. 1,59
VENTA AL PÚBLICO	S/. 5,00
GANANCIA	S/. 3,41

Recolección de muestras de agua para el análisis *in vitro* en el laboratorio – trabajo de campo – viaje San Mateo – Casapalca – La Oroya



Primera muestra: Kilómetro 94 de la Carretera Central, San Mateo, Huarochiri. 3185 m.s.n.m.

Plomo: 0,06 mg/L

Las muestras tomadas del agua fueron conservadas con ácido nítrico, observándose la alta toxicidad de estos elementos al control con la cinta Test Personal para metales pesados. Cuando las personas ingieren estos elementos en el agua, provocan anomalías y enfermedades.



Segunda muestra: Túnel Grathon, km 96 de la Carretera Central
Plomo: 0,08 mg/L



Tercera muestra: Localidad de Casapalca, km 116 de la Carretera Central
Plomo: 0,07 mg/L



Cuarta muestra: Afluente de La Oroya – Junín – Kilómetro 176 de La Carretera Central - 3750 m.s.n.m.
Plomo: 0,2 mg/L



T°MEDICOS

Centro de Ayuda al Diagnostico

LABORATORIO CLINICO ESPECIALIZADO

CENTRAL: Av. Venezuela N° 704 Of. 503 - Breña
Costado Metro (Alf. Ugarte)
Atención a domicilio
Teléfono: 330-6063 9947-9747.

"ESTAMOS HACIENDO CALIDAD"

NOMBRE: CLUB DE CIENCIAS

MUESTRA: AGUA DE RÍO

ESTUDIO SOLICITADO: ANÁLISIS CUANTITATIVO DE PLOMO EN AGUA
POR FOTOCOLORIMETRÍA

FECHA: 14 DE OCTUBRE DEL 2011

MUESTRA	LUGAR	VALOR OBTENIDO
N° 01	San Mateo	Pb: 0.06 mg/L
N° 02	Túnel Grathon	Pb: 0.08 mg/L
N° 03	Localidad de Casapalca	Pb: 0.07 mg/L
N° 04	La Oroya	Pb: 0.2 mg/L

Juan López Ricra
Lab. Clínico—Patología
CTMP 1371

4. Conclusiones

El método de bioadsorción es económico y eficaz y se adapta a nuestra realidad, pues el problema de la contaminación por plomo no solo es un problema en el río Rímac, sino también en otros departamentos del Perú a través de los cuales corren afluentes de agua contaminada. Otro ejemplo son las aguas contaminadas por plomo en La Oroya, que provocan mutaciones genéticas y enfermedades respiratorias en niños y adultos. Utilizar desechos orgánicos como la cáscara de huevo y la pepa de aceituna nos permiten un insumo sin costo alguno, de fácil recolección y de costo nulo en la vida diaria. Esta técnica de desplazamiento simple y bioadsorción puede ser utilizada en reservorios de agua creados con el fin de sedimentar y limpiar aguas contaminadas, para ser reutilizadas. Además si colocamos reservorios de cemento o plástico en cada punto de los afluentes residuales de agua desde la laguna Ticticocha hasta la rivera del río Rímac, esta agua podría ser tratada con nuestra técnica de desplazamiento simple y bioadsorción de plomo, de tal manera que el agua se reutilizaría sin turbidez y con una disminución considerable de plomo, causante de toxicidad y enfermedades degenerativas. El insumo de cáscaras de huevo que contiene el carbonato de calcio, compuesto básico para el desplazamiento del plomo, es desechable y por lo tanto asequible a nuestra realidad; la pepa de aceituna es un desecho orgánico igualmente asequible que puede ser reutilizado para bioadsorción. En provincias se utiliza la leña para generar fuego como combustible, y ese desecho puede ser reutilizado como combustible por la biomasa energética que contiene. Es decir, esta mezcla de cáscara de huevo y aceituna no solo nos sirve para limpiar el plomo del agua, sino también para desarrollar un econeocio para producir un combustible ecológico más barato.

5. Resultados

Resultado cualitativo

La concentración de plomo (II) observada en la mezcla de solución plomo más agua después de una hora de bioadsorción con la cáscara de huevo y las pepas de aceituna disminuye considerablemente, de manera visible, dejando el agua transparente, como se observa en las fotos de los anexos.

La turbidez de color naranja que se observa se debe a la oxidación de las pepas de aceituna, las cuales, al ser captadas por un radical carboxilo de un ácido orgánico, se precipitan como una sal orgánica.

Después de dos horas de tratamiento de bioadsorción, tenemos un agua visiblemente clara y con una concentración menor al nivel permitido para aguas de abastecimiento doméstico, para riego y para consumo de animales.

Resultados cuantitativos

Cuantitativamente, las cintas *Personal Test* para metales pesados en agua muestran lo siguiente:

Solución de plomo de 0,32 mg/L. Después de ser tratada con la cáscara de huevo y la pepa de aceituna presente en el líquido de decantación (agua transparente), la concentración es de 0,04 mg/L, inferior a lo estipulado por la Ley General de las Aguas. Está apta para el abastecimiento doméstico, el riego de vegetales, el consumo crudo y bebida de animales, pues el nivel permitido para su uso es de 0,05 mg/L.

Categoria Estudante Universitário

1º Lugar

ACILPOLIAMINAS DO VENENO DA ARANHA
BRASILEIRA *NEPHILENGYS CRUENTATA*:
ANTIGOS NEUROMODULADORES COMO UMA
NOVA ALTERNATIVA NO DESENVOLVIMENTO
DE FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS

Autor: Ivan Lavander Candido Ferreira, 21 anos, estudante do
6º semestre de Ciências Biológicas na Universidade de São Paulo (USP)

Professor-orientador: Pedro Ismael da Silva Junior,
Instituto Butantan

País: Brasil

“Acilpoliaminas do veneno da aranha brasileira *Nephilengys cruentata*: antigos neuromoduladores como uma nova alternativa no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos”

1. Resumo

A diversidade molecular do veneno de aranhas é estimada em até 12 milhões de compostos. Essas toxinas possuem atividades biológicas distintas, muitas das quais foram selecionadas ao longo da evolução para atuar bloqueando seletivamente seus alvos celulares. Por tal razão, toxinas de aranhas oferecem grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Na ordem Araneomorphae, o principal componente do veneno são acilpoliaminas, compostos orgânicos de baixa massa molecular, neuroativos, caracterizados por uma cabeça lipofílica e uma cauda rica em aminas, com carga positiva localizada nas aminas primárias e secundárias, o que explica sua capacidade de inibir canais iônicos seletivos para cátions. Neste trabalho, utilizando a aranha brasileira *Nephilengys cruentata* (Araneae, Nephilidae) como modelo experimental, identificamos 22 frações antimicrobianas, novos peptídeos biologicamente ativos e atividade antimicrobiana em acilpoliaminas contendo aminoácidos do veneno. Foram identificadas por MALDI-ToF/MS 18 acilpoliaminas antimicrobianas, que se mostraram capazes de inibir o crescimento de leveduras e bactérias gram-positivas clinicamente relevantes – *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Candida albicans* e *C. glabrata* – em concentrações micromolares. Tais resultados demonstram uma atividade biológica anteriormente desconhecida para esses componentes do veneno. Além disso, baseando-se em sua estrutura e em sua função, sugerimos uma origem evolutiva para acilpoliaminas no veneno de aranhas.

2. Introdução

As aranhas são os predadores terrestres mais abundantes, tendo sido reconhecidas como o grupo de animais venenosos evolutivamente mais bem-sucedido e biodiverso, com 41.253 espécies descritas e agrupadas em 3.777 gêneros em 109 famílias (HERZIG et al., 2011; PLATNICK, 2012). A diversidade molecular do veneno de aranhas é estimada em até 12 milhões de compostos. Essas toxinas possuem atividades biológicas distintas, muitas das quais foram selecionadas ao longo da evolução para atuar bloqueando seletivamente seus alvos celulares, como, por exemplo, canais de potássio dependentes de voltagem, causando uma rápida paralisia da presa (ESCOUBAS; RASH, 2004). Devido à sua grande seletividade, toxinas de aranhas foram utilizadas como ferramentas para elucidação da estrutura, da função e da farmacologia de receptores celulares (ADAMS, 2004; USHKARYOV et al., 2004), incluindo canais iônicos (DOYLE et al., 1998; MacKINNON et al., 1998) e metabotrópicos (GUHARAY; SACHS, 1984). Além disso, a grande diversidade de toxinas do veneno de aranhas tem ajudado no desenvolvimento de biotecnologias nas mais diversas áreas, como bioinseticidas (TEDFORD et al., 2004; FITCHES et al., 2004; KHAN et al., 2006; CORZO et al., 2002), drogas para o tratamento de doenças neurodegenerativas (MAZZUCA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2006; ESTRADA et al., 2007), arritmia cardíaca (BODE et al., 2001), disfunção erétil (NUNES et al., 2008) e doenças infecciosas (KOZLOV et al., 2006; JUNG et al., 2006; BUDNIK et al., 2003; HAEBERLI et al., 2000; YAN; ADAMS, 1998; SILVA JR. et al., 2000).

Diversos componentes podem ser encontrados na peçonha de aranhas, podendo apresentar distintas ações, como bloqueadores e moduladores de canais iônicos e formadores de poros de membranas (ESCOUBAS et al., 2000; CORZO; ESCOUBAS, 2003). As duas principais classes de moléculas presentes no veneno de aranhas são acilpoliaminas e peptídeos (ESCOUBAS; RASH, 2004; KUHN-NENTWIG et al., 2011). Estas duas classes de moléculas representam em torno de 60% do veneno liofilizado da maioria das aranhas estudadas (CORZO et al., 2002). Apesar da grande diversidade estimada, a maior parte dos peptídeos encontrados no veneno parece estar restrita a alguns padrões estruturais. No veneno de aranhas, a maioria dos peptídeos detectados apresenta massas entre 3,5kDa e 7,5kDa, compostas pelo motivo *Inhibitory Cystine Knot* (ICK), altamente conservado. O motivo

ICK é composto por três folhas β -pragueadas antiparalelas, interconectadas por três pontes dissulfeto pareadas entre Cys¹–Cys⁴, Cys²–Cys⁵ e Cys³–Cys⁶ – que ocupam a mesma posição relativa em todas as toxinas conhecidas e com um idêntico número de resíduos entre as cisteínas (ESCOUBAS; RASH, 2004). A filogenia molecular dessas toxinas sugere que elas se tenham originado de genes relacionados à β -defensina, uma classe de peptídeos antimicrobianos amplamente distribuídos. As toxinas teriam originado-se por duplicação gênica de um ou mais genes relacionados às defensinas nas glândulas de veneno, sofrendo diversificação e neofuncionalização (FRY et al., 2009). Diversas evidências corroboram a hipótese do “recrutamento” de β -defensinas no veneno: enquanto β -defensinas de *Drosophila melanogaster* também bloqueiam canais de sódio dependentes de voltagem de maneira idêntica ao mecanismo de atuação de neurotoxinas contendo o motivo ICK de aracnídeos (COHEN et al., 2009), a expressão de neurotoxinas contendo o motivo ICK de escorpiões é induzida pela infecção por bactérias (GAO et al., 2007). Além disso, diversas dessas neurotoxinas de aracnídeos são potentes antimicrobianos (REDAELLI et al., 2010), e alguns peptídeos antimicrobianos encontrados no veneno atuam sinergicamente com neurotoxinas do veneno, aumentando sua potência contra alvos celulares específicos (KUHN-NENTWIG et al., 2004).

Com o surgimento de linhagens de microorganismos resistentes aos antibióticos convencionais, torna-se cada vez mais importante a busca por novas moléculas capazes de substituir, de forma eficiente, os antibióticos utilizados clinicamente (WALSH, 2003). Por atuar em diferentes compartimentos celulares (NGUYEN et al., 2011) e ter um espectro de ação mais amplo do que os antibióticos convencionais, apresentando inclusive mecanismos de ação alternativos aos antibióticos utilizados clinicamente (SANG; BLECHA, 2008), os peptídeos antimicrobianos são candidatos promissores para o desenvolvimento de drogas que combatam patógenos multirresistentes (DAFFRE et al., 2001, GORDON et al., 2005; NGUYEN et al., 2011). Uma vez que os peptídeos antimicrobianos do veneno de aranhas já foram selecionados ao longo dos últimos 300 milhões de anos de sua evolução, seu estudo e sua caracterização constituem um modo eficiente para a descoberta de fármacos promissores, incluindo uma nova classe de antibióticos.

Entretanto, das 109 famílias de aranhas conhecidas, 95 pertencem à ordem Araneomorphae, representando a maior diversidade para este grupo

de animais venenosos (PLATNICK, 2012). Neste táxon, o principal componente do veneno são acilpoliaminas (KUHN-NENTWIG et al., 2011) – compostos orgânicos de baixa massa molecular, neuroativos, caracterizados por uma cabeça lipofílica e uma cauda rica em aminas com carga positiva localizada nas aminas primárias e secundárias, o que explica sua capacidade de inibir canais iônicos seletivos para cátions, como, por exemplo, canais de potássio e cálcio dependentes de voltagem (MELLOR; USHERWOOD, 2004). Por sua ampla diversidade, por atuarem seletivamente em canais iônicos específicos e por sua baixa massa molecular e sua grande facilidade de síntese, essas moléculas oferecem grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, inclusive para o tratamento de doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (ESTRADA et al., 2007). Uma vez que a coocorrência de acilpoliaminas com potencializadores (por exemplo, neurotransmissores) não é obrigatória, é possível concluir que o efeito do veneno de uma vasta diversidade de aranhas é devido primariamente a essa classe de moléculas (KUHN-NENTWIG et al., 2011) .

Acilpoliaminas são classificadas entre não contendo aminoácidos, distribuídas entre todas as aranhas, e contendo aminoácidos, restritas às aranhas das famílias Nephilidae e Araneidae (KUHN-NENTWIG et al., 2011). Até o momento, são conhecidas 82 acilpoliaminas contendo aminoácidos: 18 de aranhas do gênero *Araneuse* e *Argiope* da família Araneidae e 64 de Nephilidae (ITAGAKI et al., 1997). Foram identificadas 42 acilpoliaminas no veneno de *Nephilengys borbonica* , e 25 acilpoliaminas foram detectadas no veneno de *N. cruentata* (PALMA et al., 1997). Outras 15 acilpoliaminas foram identificadas, porém sua estrutura ainda não foi solucionada (PALMA, 2005). Curiosamente, não se conhecem peptídeos contendo o motivo ICK em Nephilidae, o que sugere um padrão evolutivo divergente em comparação ao veneno de outras aranhas. A hipótese mais aceita para explicar esse fato seria a de que os peptídeos antimicrobianos neurotóxicos (ICK-*like*) teriam sido substituídos por acilpoliaminas, uma vez que isso seria energeticamente mais vantajoso, e teriam sido selecionados positivamente ao longo da evolução (KUHN-NENTWIG et al., 2011). No caso das aranhas *Araneus ventricosus* e *Caerostris extrusa* (Araneomorphae, Araneidae), três peptídeos são conhecidos, porém não se conformam de acordo com o motivo ICK, e parecem atuar primariamente como inibidores de proteases (HERZIG et al., 2011; JUNG et al., 2002; KUHN-NENTWIG et al., 2011).

Dado o grande potencial farmacológico de toxinas das aranhas, a identificação de suas toxinas por meio de sua atividade biológica (*screening* funcional), aliada a uma abordagem combinada de métodos de fracionamento por cromatografia analítica e caracterização por espectrometrias de massa (MS/MS), constitui um método promissor para a descoberta de novos produtos naturais, especialmente peptídeos antimicrobianos e acilpoliaminas (GORDON et al., 2005, ESTRADA et al., 2007; BULLET, 2008). Neste contexto, paralelamente à Araneidae, a Nephilidae compõe um grupo-alvo no estudo do veneno por sua unicidade de composição, sendo as únicas famílias cujo veneno possui acilpoliaminas contendo aminoácidos.

Neste trabalho, utilizando a aranha brasileira *Nephilengys cruentata* (Araneae, Nephilidae) como modelo experimental, identificamos pela primeira vez peptídeos antimicrobianos (1,0kDa-2,2kDa) no veneno de Nephilidae. Além disso, identificamos atividade antimicrobiana em acilpoliaminas contendo aminoácidos do veneno, uma função biológica anteriormente desconhecida para essas moléculas. Por fim, com base em sua estrutura e função, sugerimos uma origem evolutiva para essas biomoléculas no veneno de aranhas. As Acilpoliaminas pertencem a uma classe tradicionalmente reconhecida por seu potencial no desenvolvimento de drogas neuromoduladoras, e que apresentamos pela primeira vez como uma nova classe para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos.

3. Objetivos

O objetivo deste trabalho é caracterizar moléculas (peptídeos e acilpoliaminas) com atividade antimicrobiana do veneno da aranha *Nephilengys cruentata* (Araneae: Nephilidae).

4. Material e métodos

4.1. Animais e coleta de veneno

Fêmeas da espécie *Nephilengys cruentata* foram coletadas no Instituto Butantan, sob licença de coleta de material zoológico nº 11024-3 – IBAMA, e Autorização Especial de Acesso ao Patrimônio Genético nº 001/2008. O veneno foi obtido por estimulação elétrica. O veneno extraído foi submetido

a uma centrifugação a 14.000 x g durante quatro minutos. A fração solúvel foi utilizada no fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.2. Extração e purificação de frações antimicrobianas

A fração solúvel do veneno obtido anteriormente foi concentrada em uma centrífuga a vácuo (Savant Instruments, Inc.). Após a centrifugação, o material foi ressuscitado em ácido trifluoracético (TFA) 0,05% e aplicado em colunas descartáveis SEP-PAK C18, ligadas em série. Foram realizados três estágios de eluição, utilizando sucessivamente diferentes concentrações de acetonitrila (5%, 40% e 80%).

As frações resultantes foram concentradas em uma centrífuga a vácuo, ressuscitadas em água Milli/TFA 0,05% e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A purificação foi realizada à temperatura constante, utilizando o sistema CLAE Shimadzu. A absorbância foi monitorada a 225nm e 280nm. As três frações foram aplicadas em uma coluna de fase reversa semipreparativa Júpiter C18, e as eluições foram realizadas por gradientes de acetonitrila (ACN) em água acidificada (TFA 0,05%) de 0% a 20%, 2% a 60% e 20% a 80%, respectivamente, por 60 minutos, sob um fluxo de 1,5/min.

As frações correspondentes aos picos foram coletadas manualmente, concentradas em uma centrífuga a vácuo e reconstituídas em água Milli-Q, para serem avaliadas quanto à presença de atividade antimicrobiana.

4.3. Bioensaios

A presença de atividade antimicrobiana foi determinada por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido, como descrito anteriormente (BULET, 2008). A atividade antimicrobiana foi avaliada utilizando os seguintes micro-organismos: a bactéria *Micrococcus luteus* A270 (gram-positiva), *Escherichia coli* SBS 363 (gram-negativa) e *Candida albicans* MDM8 (levedura). A medida de absorbância das culturas, após as incubações, foi realizada em um leitor de microplaca Victor 1420 (Perkin Elmer™) a 595nm. Os micro-organismos *Escherichia coli* SBS 363 e *Micrococcus luteus* A270 foram obtidos da coleção do Instituto Pasteur, Paris. *Candida albicans* MDM8 foi obtida da Coleção do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil. As bactérias *Staphylococcus aureus*

ATCC29213 e *S. epidermidis* ATCC12228 (gram-positivas) foram obtidas junto ao *American Type Culture Collection* (ATCC).

4.3.1. Atividade antibacteriana

A um volume de 20 μ l da fração a ser testada ou de água (controle), aplicado em poços de uma microplaca, são adicionados 80 μ l de meio de cultura pobre em nutrientes [PB: bactopectona 1%; NaCl 0,5% (m:v); pH 7,4] contendo uma suspensão de uma cultura de bactérias em fase logarítmica de crescimento. O crescimento é avaliado por medida da absorbância da cultura após 18 horas de incubação a 30°C. Este procedimento é baseado nos ensaios descritos por Bulet et al. (1993).

Para controle positivo em ensaios com bactérias, foi utilizado o antibiótico tetraciclina. Como controle negativo, foram utilizados água esterilizada e meio de cultura.

4.3.2. Atividade antifúngica

O inóculo da levedura *Candida albicans* MDM8 ou *C. glabrata* IOC 45658 (concentração final: 10⁴ células/ml) foi ressuspensa em um meio de crescimento contendo dextrose de batata 1,2% (m:v) (PDB, Difco), half strength, suplementado com tetraciclina (10 μ g/ml). Aliquotas dessa suspensão foram dispensadas em poços de uma microplaca contendo 20 μ l de água ou da fração a ser analisada. O crescimento da levedura foi avaliado por medida da absorbância da cultura a 595nm após 18 horas de incubação a 30°C.

4.4. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa foi utilizada para controlar a pureza das amostras durante as etapas de purificação e análise estrutural das moléculas presentes nas frações com atividade antimicrobiana.

As análises foram realizadas por MALDI-ToF-MS (matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight – mass spectrometry) ou LC-ESI-Q-ToF/MS (liquid chromatography-electrospray ionization – quadrupole – time of flight/mass spectrometry). A espectrometria de massas por MALDI-ToF/MS foi realizada em um equipamento Ettan MALDI-ToF/Pro (Amershan Biosciences, Suécia), operando em modo reflectron (para valores de massa/carga [m/z] até 10.000) e positivo (detecção de íons carregados positivamente). Neste tipo de espectroscopia, as moléculas depositadas em uma fina camada de cristais

de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico são sublimadas com o uso do laser (337nm), e ionizam-se pela aquisição de prótons. Essas moléculas são aceleradas através de um campo elétrico, sendo direcionadas para um analisador de tempo de voo, que permite determinar a relação massa/carga (m/z) dos íons formados ao longo do tempo que o íon leva para atingir o detector. Utilizou-se por análise 0,35 μ l das frações com atividades antimicrobiana. Após a evaporação do solvente (H₂O ou ACN/H₂O 1:1) da amostra em temperatura ambiente, adicionou-se 0,35 μ l de matriz. Os espectros finais foram obtidos após o acúmulo de 200 espectros simples ou após cinco minutos de análise, iniciando com 34% de energia do laser, calibrados posteriormente. A calibração do equipamento foi realizada com um padrão de peso molecular contendo os peptídeos angiotensina II e P₁₄R (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), com massas moleculares monoisotópicas 1.045,53Da e 1.532,86 Da, respectivamente.

A técnica de LC-ESI-Q-ToF/MS foi realizada em um equipamento Q-ToF Micro™ (Micromass, UK), acoplado a um sistema de cromatografia líquida em nanoescala nanoACQUITY ultraPerformance LC (Waters). As amostras a serem analisadas foram ressuspensas em 20 μ l de ACN/H₂O (1:1), com ácido fórmico 0,1%, e submetidos à análise por infusão direta sob fluxo de 0,5 μ l/min em uma seringa de 50 μ l (Hamilton, Reno, NV, EUA). A fragmentação dos íons mono ou duplamente carregados foi realizada sob diferentes energias de colisão contra gás inerte (argônio), para que os melhores espectros de MS/MS pudessem ser utilizados no sequenciamento. Os espectros foram adquiridos a cada 0,5 segundo e a composição final de espectros foi obtida após 1,5min de aquisição. Os espectros de dissociação induzida por colisão (DIC) contra moléculas de gás inerte (Ar) foram deconvoluídos com a ferramenta MaxEnt3 (disponível no software do MaxLynx 4.1), para que os íons com mais de uma carga fossem convertidos em monocarregados. O assinalamento dos valores de m/z correspondentes às séries $-y$ e $-b$ foi feita com o auxílio do aplicativo Peptide Sequencing (MassLynx 4.1, Waters). As sequências obtidas foram utilizadas para analisar a similaridade em relação a outras toxinas conhecidas por alinhamento, utilizando o software Clustal X.

4.5. Dosagem de proteína total

Para a quantificação da proteína total, o veneno bruto foi submetido ao ensaio de dosagem de proteína total pelo método Bradford (1976). Nesse ensaio, a albumina bovina (BSA) foi utilizada como proteína calibrante. A leitura foi realizada no equipamento leitor de microplaca Victor 1420 (PerkinElmer™) a 495nm.

5. Resultados e discussões

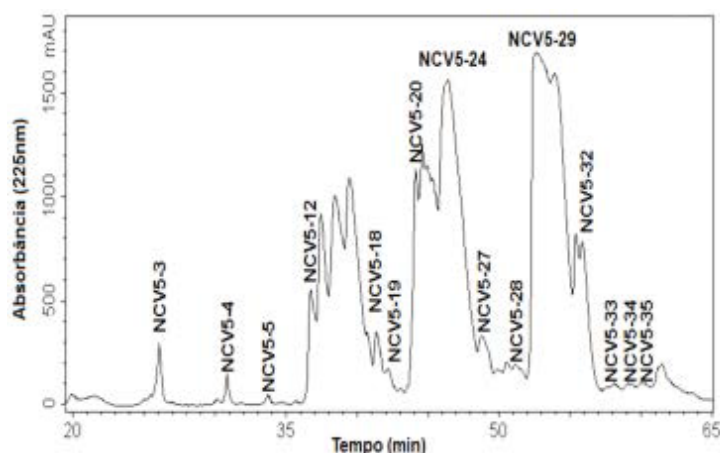
5.1. Pré-purificação do veneno

O veneno obtido das aranhas foi primeiramente submetido a uma pré-purificação, utilizando colunas descartáveis SEP-PAK C18. O veneno foi eluído em três concentrações diferentes de acetonitrila (5%, 40% e 80%). As três frações obtidas foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os picos obtidos da purificação das frações Sep Pak 5%, 40% e 80% foram coletados manualmente e submetidos a ensaios de inibição de crescimento em meio líquido, utilizando as bactérias *M. luteus*, *E. coli* e a levedura *C. albicans*. Neste trabalho, não analisamos a fração eluída a ACN80%.

5.2. Purificação do veneno – Sep Pak 5%

Frações antimicrobianas obtidas do veneno eluído com ACN 5% foram analisadas em uma coluna semipreparativa Júpiter C18, com gradiente linear de acetonitrila de 0% a 20% em água acidificada por 60min, em um fluxo de 1,5ml/min. Dezesete picos apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria gram-positiva *Micrococcus luteus* e a levedura *Candida albicans*, e correspondem às frações NCV5: 3, 4, 5, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 27, 28, 29, 32, 33, 34 e 35 (Figura 1).

Figura 1. Purificação da fração Sep Pak 5% do veneno de *Nephilengys cruentata*, analisado em uma coluna semipreparativa Júpiter C18, com gradiente linear de acetonitrila de 0%-20% em água acidificada (TFA 0,05%) por 60min, em um fluxo de 1,5ml/min. Em destaque, as frações que apresentaram atividade antimicrobiana.

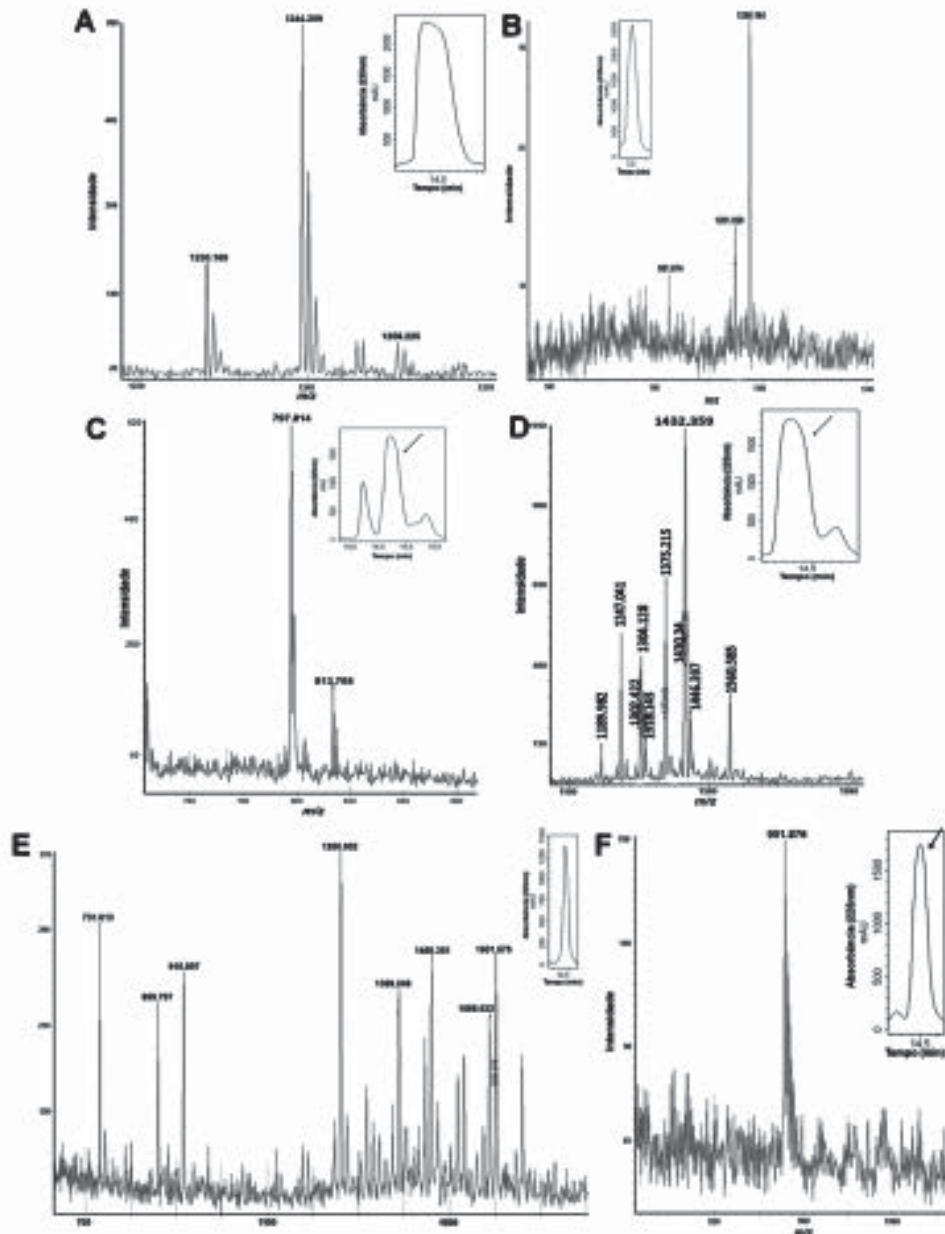


Essas frações foram analisadas por espectrometria de massas (MALDI-ToF/MS). No entanto, os resultados das frações NCV5 3-12, 24, 27, 32, 33 e 35 foram inconclusivos. Para as demais frações, os resultados indicaram que não estavam puras, e elas foram submetidas a uma nova etapa de purificação, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em uma coluna analítica Júpiter C18. Apenas as frações com atividade antimicrobiana foram submetidas à análise por espectrometria de massa, para verificar sua homogeneidade. Os resultados das análises de massa para as frações NCV5-18-1, NCV5-19-1, NCV5-20-1, NCV5-28-1, NCV5-29-1 e NCV5-34-1, derivadas da purificação analítica, são apresentados na Figura 2.

5.3. Identificação por espectrometria de massas

Quando comparadas com a literatura, as massas identificadas nessas frações mostraram-se similares ou idênticas a toxinas previamente caracterizadas para o veneno de *Nephilengys cruentata* (PALMA et al., 1997). As toxinas com massa molecular >1.000Da são acilpoliaminas contendo arginina, que atuam seletivamente como bloqueadoras de canais glutamérgicos (GluR) e possuem atividade neurotóxica. Essas acilpoliaminas foram anteriormente classificadas em quatro grupos (A-D), de acordo com sua estrutura (ITAGAKI et al., 1997; PALMA et al., 1997; PALMA, 2005; KUHN-NENTWIG et al., 2011). A Tabela I sumariza a estrutura, a massa molecular, a atividade antimicrobiana e a identificação correspondente dessas toxinas. Uma vez que a fração NCV5-34-1 foi considerada homogênea, contendo uma acilpoliamina de massa molecular igual a 950,87, sua atividade antimicrobiana foi testada e comprovada contra as bactérias clinicamente relevantes *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*.

Figura 2. Espectrometria de massas (MALDI-ToF/MS) das frações antimicrobianas do veneno de *Nephilengys cruentata* e suas respectivas purificações, por CLAE-FR (cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa), utilizando uma coluna analítica Júpiter C18 (250mmX4,6mm), em detalhe. A seta indica a fração à qual o espectro corresponde. Apenas frações antimicrobianas foram analisadas.



A) Espectro de massas da fração antimicrobiana NCV5-18-1, com sua respectiva purificação analítica em detalhe. O resultado mostra a presença de moléculas similares a peptídeos (1,2kDa). B) Espectrometria de massas da fração NCV5-19-1 (purificação analítica em detalhe). O resultado mostra a presença de três moléculas, uma possível acilpoliamina ($[M+H^+]=951.675$) e toxinas peptídicas (1,2kDa). C) Espectrometria de massas da fração antimicrobiana NCV5-20-1, contendo acilpoliaminas. D) Espectrometria de massas da fração NCV5-28-1. Nesta fração foi possível observar os seguintes $[M/Z]$ s, 1189.982, 1247.041, 1304.128, 1375.215, 1430.34, 1432.359, 1446.397, 1560.585, que correspondem a peptídeos (1,1-1,5kDa). E) MALDI-ToF/MS da fração antimicrobiana NCV5-29-1 e sua respectiva purificação analítica. Esta fração apresentou $[M/Z]$ s correspondentes a acilpoliaminas (731.613, 859.797, 916.897) e peptídeos (1260.002, 1389.248, 1460.351, 1588.522, 1601.575). F) Espectrometria de massas a purificação até a homogeneidade da fração NCV5-34-1 correspondente a uma acilpoliamina de $(M+H^+)=951.876$.

Tabela I. Atividade antimicrobiana e identificação de acilpoliaminas do veneno de *Nephilengys cruentata*.

Nome	Fração	Massa Observada	Atividade Antimicrobiana			Descrição
			<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	
Tipo A						
NPTX-730	NCV5-29-1	730.613	X	X	-	Palma et al, 1997
NPTX856-like	NCV29-1	858.797	X	X	-	Palma et al, 1997
Tipo C						
NPTX927-like	NCV5-19-1	950.674	X	X	-	Palma et al, 1997
NPTX927-like	NCV5-34-1	950.876	X	X	-	
Tipo D						
NPTX816-like	NCV5-20-1	812.765	X	X	-	Palma et al, 1997
NPTX799-like	NCV5-20-1	796.814	X	X	-	Palma et al, 1997
Desconhecida						
	NCV5-29-1	916.897	X	X	-	Este trabalho

Legenda:

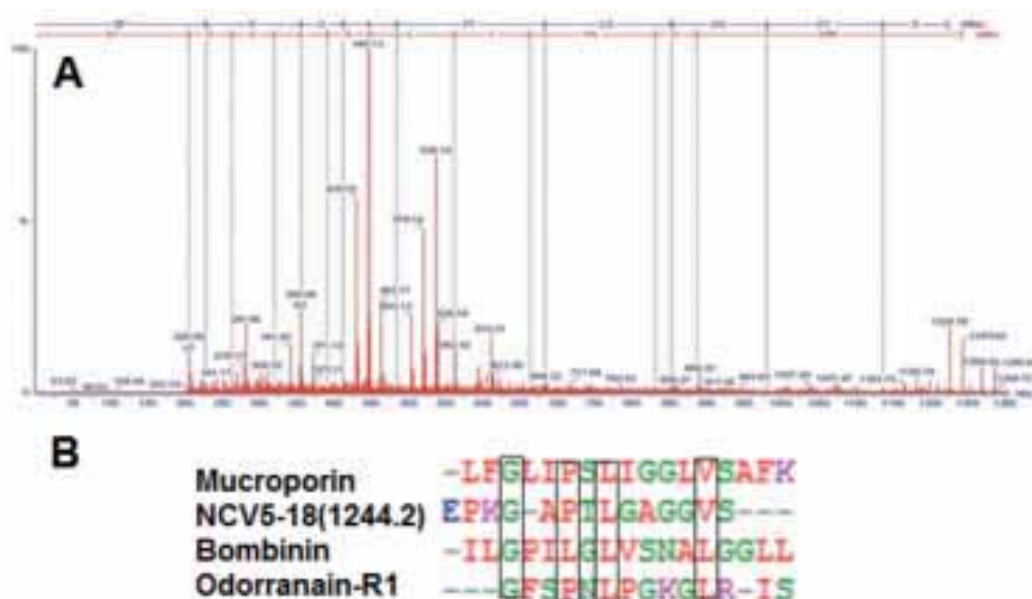
(X) = atividade antimicrobiana positiva para o micro-organismo assinalado.

(-) = atividade antimicrobiana negativa para o micro-organismo assinalado.

Na fração NCV5-18-1, foi possível realizar o sequenciamento parcial utilizando a técnica de MS/MS. O íon +1 (1244.2) foi selecionado e induzido à dissociação via colisão (DIC), em um aparelho ESI-Q-ToF/MS. A sequência obtida – EPKGAPTLGAGGVS – é rica em glicina, e apresentou similaridade de 42,5% em relação a Mucroporina, um peptídeo antimicrobiano catiônico identificado no veneno do escorpião *Lychas mucronatus* (DAÍ et al., 2008), e similaridade inferior a 40% em relação a Bombinina H7, peptídeo secretado pela pele de um anfíbio (MANGONI et al., 2000) e a Odorranain-R1, outro peptídeo catiônico também secretado pela pele de anfíbios (ASOODEH et al., 2011). Esses peptídeos foram utilizados para alinhamento, utilizando o software Clustal X (Figura 3).

As massas identificadas por MALDI-ToF/MS foram utilizadas para identificar peptídeos similares por “mass fingerprint”. Os peptídeos identificados na fração NCV5-28-1, de massas moleculares 1302.422, 1304.422, 1430.34, 1432.359 e 1560.385, apresentaram similaridade em relação às neurotoxinas Ergotoxin-like (Uniprot ID: Q86QV9.1): AGDRAGTCVYYK (1302.59Da) e YGYYGQCDECCKK (1559.72Da), que pertencem ao grupo λ KTx do escorpião mexicano *Centruroides noxious*, e atuam inibindo canais de potássio dependentes de voltagem. Os peptídeos identificados e sua atividade antimicrobiana estão sumarizados na Tabela II. Esses peptídeos foram nomeados de acordo com uma nomenclatura descrita anteriormente (KING et al., 2008).

Figura 3. Estrutura primária do peptídeo antimicrobiano de 1,2kDa do veneno de *Nephilengys cruentata*.



A) Sequenciamento “de novo” (MS/MS) do peptídeo de 1,244Da. O espectro de DIC foi adquirido com diferenças de potenciais de 15V e 20V na célula de colisão do seu íon unicamente carregado ($[M+H]^+$, equivalente ao m/z de 1245, com tolerância de 1,2Da). Os íons pertencentes às séries -y e -b, assinalados na parte superior do espectro, elucidaram a estrutura primária do peptídeo: EPKGAPTLGAGGVS (1240.34Da). B) Resultado do alinhamento dos peptídeos via Clustal X. Resíduos conservados assinalados.

Tabela II. Atividade antimicrobiana, identificação e nomenclatura dos peptídeos identificados no veneno de *Nephilengys cruentata*.

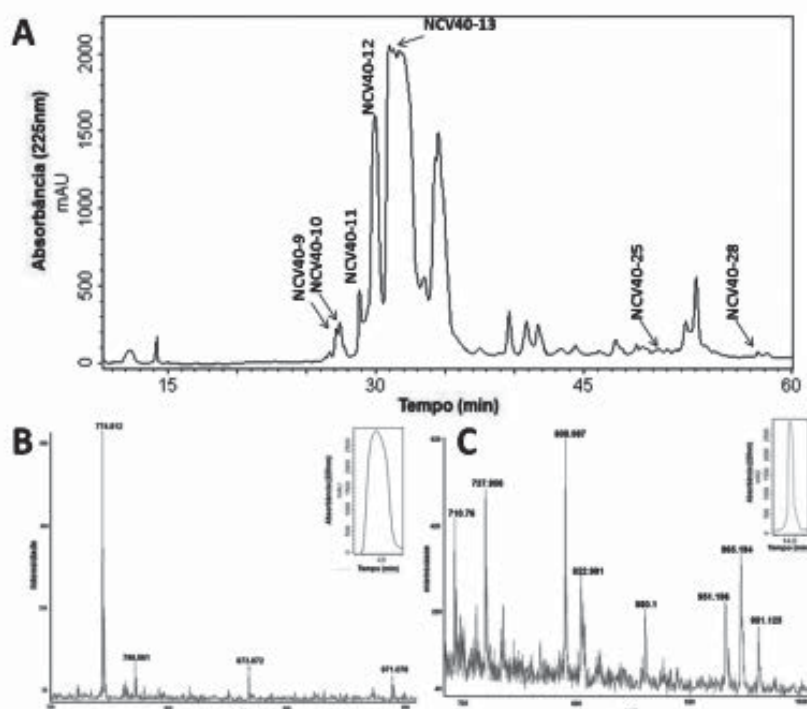
Fração	Nome Proposto	Massa Observada	Atividade Antimicrobiana			Similaridade	Método para Identificação
			<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>		
NCV5-18-1	U-nephilatoxin-Nc1a	1244.209	X	X	-	Mucroporin-like	LC-ESI/MS
	U-nephilatoxin-Nc1b	1230.169	X	X	-	-	-
	U-nephilatoxin-Nc1c	1258.225	X	X	-	-	-
NCV5-19-1	U-nephilatoxin-Nc1c	1258.194	X	X	-	-	-
	U-nephilatoxin-Nc1d	1201.029	X	X	-	-	-
NCV5-28-1	U-nephilatoxin-Nc2	1189.962	X	X	-	-	-
	U-nephilatoxin-Nc1e	1247.041	X	X	-	-	-
	U-nephilatoxin-Nc3a	1302.422	X	X	-	Erg toxin-like	MALDI-ToF/MS
	U-nephilatoxin-Nc3b	1304.128	X	X	-	Erg toxin-like	MALDI-ToF/MS
	U-nephilatoxin-Nc3c	1318.143	X	X	-	-	-
	U-nephilatoxin-Nc4	1375.215	X	X	-	-	-
	U-nephilatoxin-Nc5a	1430.34	X	X	-	Erg toxin-like	MALDI-ToF/MS
	U-nephilatoxin-Nc5b	1432.359	X	X	-	Erg toxin-like	MALDI-ToF/MS
	U-nephilatoxin-Nc5c	1446.397	X	X	-	-	-
U-nephilatoxin-Nc6	1560.385	X	X	-	Erg toxin-like	MALDI-ToF/MS	
NCV5-29-1	U-nephilatoxin-Nc1e	1260.002	X	X	-	-	-
	U-nephilatoxin-Nc8	1389.348	X	X	-	-	-
	U-nephilatoxin-Nc9	1460.351	X	X	-	-	-
	U-nephilatoxin-Nc10	1588.522	X	X	-	-	-
	U-nephilatoxin-Nc11	1601.575	X	X	-	-	-

5.4. Purificação do Veneno – Sep Pak 40%

Dez frações da eluição em 40% apresentaram atividade antimicrobiana contra o fungo *C. albicans*: NCV40-9, NCV40-10, NCV40-11, NCV40-12, NCV40-13, NCV40-14, NCV40-15, NCV40-17, NCV40-25 e NCV40-28. A fração NCV40-12 teve ação também contra *E. coli*. Já contra *M. luteus*, apenas a fração NCV40-21 teve atividade. Uma vez que essas frações não estavam homogêneas por verificação em espectrometria de massas, foi realizada uma segunda purificação das dez amostras, por meio da cromatografia líquida de alta eficiência em uma coluna analítica Júpiter C18 (dados não mostrados). As frações resultantes dessa repurificação foram submetidas à análise por MALDI-ToF/MS (Figura 4).

A Tabela III sumariza as atividades antimicrobianas, identificação e as massas moleculares detectadas para as frações antimicrobianas encontradas durante esse fracionamento.

Figura 4. Purificação de acilpoliaminas antimicrobianas do veneno de *Nephilengys cruentata*.



A) A fração do veneno eluído a ACN 40% foi analisada em uma coluna semipreparativa Júpiter C18, com gradiente linear de acetonitrila de 2% a 60%, em água acidificada por 60min, em um fluxo de 1,5 ml/min. Em destaque, os picos que apresentaram atividade antimicrobiana. B) Espectro de massa da fração NCV40-9-1, no qual se destaca a presença de um pico de M/Z 774.812, correspondente a acilpoliaminas. A purificação desta amostra, feita em uma coluna analítica, é mostrada no detalhe. C) Espectro de massa da fração antimicrobiana NCV40-14-1, mostrando a presença de acilpoliaminas. No detalhe, a purificação desta amostra em uma coluna analítica Júpiter C18.

Tabela III. Atividade antimicrobiana, massa molecular e identificação das acilpoliaminas encontradas na purificação da fração Sep Pak 40% do veneno de *Nephilengys cruentata*.

Nome	Fração	Massa Observada	Atividade Antimicrobiana			Descrição
			<i>M. luteus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	
Tipo A						
NPTX872	NCV40-9-1	872.87	X	X	-	Itagaki et al, 1997
Tipo B						
NPTX773	NCV40-14-1	773.812	X	X	-	Itagaki et al, 1997
Desconhecidas						
		796.861	X	X	-	Este trabalho
		971.078	X	X	-	
		710.76	X	X	-	
		736.906	X	X	-	
		808.987	X	X	-	
		822.991	X	X	-	
		880.1	X	X	-	
		951.196	X	X	-	
		965.194	X	X	-	
		981.125	X	X	-	

Legenda:

(X) = atividade antimicrobiana positiva para o micro-organismo assinalado.

(-) = atividade antimicrobiana negativa para o micro-organismo assinalado.

6. Discussões

As frações obtidas nas diversas etapas de purificação foram analisadas por espectrometria de massas do tipo MALDI-ToF-MS e ESI-LC-MS. Como resultado, identificamos 16 frações com atividade antimicrobiana na purificação do material eluído a ACN 5%. As frações NCV5-3, NCV5-4, NCV5-15, NCV5-16 e NCV5-17 apresentaram ação antimicrobiana contra a levedura *C. albicans*, e as bactérias *M. luteus* e *E. coli*. As frações NCV5-5, NCV5-18, NCV5-19, NCV5-20, NCV5-24, NCV5-27, NCV5-28, NCV5-29, NCV5-32, NCV5-33 e NCV5-34 inibiram o crescimento da bactéria *M. luteus* e *C. albicans*. Foi possível identificar 19 novos peptídeos com atividade antimicrobiana, de massas moleculares (em Da) 1244.209, 1230.169, 1258.225, 1201.029, 1189.982, 1247.041, 1302.422, 1304.128, 1318.143, 1375.215, 1430.34, 1432.359, 1446.397, 1560.385, 1260.002, 1389.248, 1460.351, 1588.522, 1601.575, que foram nomeados (de acordo com a nomenclatura de KING et al., 2008), respectivamente: U-nephilatoxin-Nc1a, U-nephilatoxin-Nc1b, U-nephilatoxin-Nc1c, U-nephilatoxin-Nc1d, U-nephilatoxin-Nc2, U-nephilatoxin-Nc1e, U-nephilatoxin-Nc3a, U-nephilatoxin-Nc3b, U-nephilatoxin-Nc3c, U-nephilatoxin-Nc4,

U-nephilatoxin-Nc5a, U-nephilatoxin-Nc5b, U-nephilatoxin-Nc5c, U-nephilatoxin-Nc6, U-nephilatoxin-Nc1e, U-nephilatoxin-Nc8, U-nephilatoxin-Nc9, U-nephilatoxin-Nc10 e U-nephilatoxin-Nc11. A análise por MS/MS do peptídeo U-nephilatoxin-Nc1a (1244.2Da) sugere que este possua 42,5% de similaridade com relação ao peptídeo antimicrobiano Mucroporina, do escorpião *Lychas mucronatus*. As toxinas U-nephilatoxin-Nc3a (1302.422Da), U-nephilatoxin-Nc3b (1304.128Da), U-nephilatoxin-Nc5a (1430.34Da), U-nephilatoxin-Nc5b (1432.359Da), U-nephilatoxin-Nc6 (1560.385Da) apresentaram similaridade em relação às neurotoxinas Ergotoxin-like (Uniprot ID: Q86QV9.1): AGDRAGTCVYYK (1302.59Da) e YGYYGQCDECKK (1559.72Da), que pertencem ao grupo λ KTx do escorpião mexicano *Centruroides noxious* e atuam inibindo canais de potássio dependentes de voltagem. Este é o primeiro relato de toxinas peptídicas no veneno de Nephilidae do qual temos conhecimento.

Além disso, foi possível identificar acilpoliaminas contendo aminoácidos (arginina) com atividade antimicrobiana. Ao todo, 18 acilpoliaminas foram identificadas, e correspondem às massas 872.87Da (NPTX872), 773.812Da (NPTX773), 730.613Da (NPTX730), 858.79Da (NPTX856-like), 950.67Da (NPTX 927-like), 812.76Da (NPTX816-like), 796.81Da (NPTX799-like), 916.89Da, 796.861Da, 971.078Da, 710.76Da, 736.906Da, 808.987 Da, 822.991Da, 880.1Da, 951.196Da, 965.194Da, 981.125Da. Esses resultados demonstram uma atividade biológica anteriormente desconhecida para esses componentes do veneno. Onze acilpoliaminas não puderam ser identificadas, e possivelmente são novas. Futuramente, essas acilpoliaminas serão purificadas até a homogeneidade, utilizando cromatografia em fase normal ou de troca iônica, e suas estruturas serão determinadas por MS/MS e/ou NMR. A fração NCV5-34-1, contendo uma acilpoliamina de massa molecular igual a 950.87Da, foi considerada homogênea, e apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias clinicamente relevantes *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*, e as leveduras *Candida albicans* e *C. glabrata* – resistentes a fármacos convencionais.

A Nephilidae é conhecida por aplicar o veneno em suas teias orbiculares, possivelmente podendo paralisar a presa pela ação de neurotoxinas que foram depositadas sobre a teia (KUHNS-NENTWIG et al., 2011). No entanto, nossos resultados indicam que o componente principal do veneno dessas aranhas da ordem Araneomorphae pode atuar primariamente na defesa contra patógenos.

Do ponto de vista estrutural, apesar de termos identificado acilpoliaminas de todos os grupos anteriormente identificados em *Nephilengys cruentata* (tipos A-D) que variam principalmente quanto ao número de unidades de putreanina (de 0 a 4 unidades, dependendo do tipo de acilpoliamina) que compõem a cauda de poliamina, a atividade antimicrobiana mantém-se qualitativamente a mesma, isto é, inibindo o crescimento de bactérias gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*) e leveduras (*C. albicans*, *C. glabrata*). Portanto, nossos resultados sugerem que a atividade antimicrobiana pode ser causada pelo motivo conservado – a cabeça lipofílica composta por ácido 4-hidróxi-indolacético.

Anteriormente, uma acilpoliamina composta por uma única unidade de poliamina (espermidina) e duas cabeças lipofílicas (compostas por ácido dihidroxibenzóico) foi identificada no sistema imune da aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*. Denominada Mygalina (CHEBI ID: 64901), é produzida nos hemócitos (FUKUZAWA et al., 2008), apresenta potente atividade bactericida em concentrações micromolares contra bactérias gram-negativas (PEREIRA et al., 2007), e possui atividade imunomoduladora, induzindo a síntese de espécies reativas de oxigênio e IFN- γ (MAFRA et al., 2012). O fato de esta acilpoliamina ser produzida nos hemócitos, juntamente com peptídeos antimicrobianos, como a gomesina e a acanthoscurrina, além de sua função e sua estrutura, sugere que possua uma atividade sinérgica com estes fatores.

Assim como as neurotoxinas peptídicas de aranhas – as toxinas contendo o motivo ICK – originaram-se de peptídeos antimicrobianos, como defensinas (FRY et al., 2009), nossos resultados suportam a ideia de que acilpoliaminas do veneno possam ter surgido de uma acilpoliamina ancestral do sistema imune, como a Mygalina. Tal qual a Mygalina, no veneno de todas as aranhas estudadas até o momento foi possível identificar acilpoliaminas que não possuem aminoácidos, e apenas em Nephilidae e Araneidae surgiram acilpoliaminas contendo aminoácidos (KUHN-NENTWIG et al., 2011). Enquanto a cauda de poliaminas atua em canais iônicos causando seu efeito neuromodulador, desejável para a rápida paralisia da presa, no sistema imune foi selecionada, ao longo da evolução, uma acilpoliamina com maior número de cabeças lipofílicas. Além disso, Silva Jr. e Melo (2010) demonstraram, pela síntese de análogos da Mygalina, que um maior número de cabeças lipofílicas potencializa a atividade antimicrobiana

da Mygalina, adicionando sucessivamente cabeças lipofílicas à cauda de poliamina. Enquanto as evidências de seleção positiva para um maior número de unidades lipofílicas em acilpoliaminas do sistema imune e um maior número de unidades de poliamina que se relacionam com sua atividade neuromoduladora, o aparecimento de aminoácidos em acilpoliaminas de Nephilidae e Araneidae deve ser uma estratégia evolutivamente divergente e selecionada ao longo da evolução, que pode guiar o design racional de novas drogas – tanto antimicrobianos como neuromoduladores.

Para quantificar a atividade antimicrobiana e testar seu potencial sinérgico com neurotoxinas peptídicas, será realizada a síntese química de acilpoliaminas, utilizando 2-nitrobenzenosulfanomida, conforme descrito anteriormente (NIHEI et al., 2006). Pretendemos testar também, por inferência filogenética, a hipótese de que acilpoliaminas tenham origem em um composto similar à Mygalina. Em conclusão, identificamos atividade antimicrobiana em acilpoliaminas do veneno de aranhas, e identificamos, pela primeira vez, 19 peptídeos no veneno de Nephilidae, cuja estrutura será elucidada futuramente.

7. Agradecimentos

Este projeto tem o apoio do CNPq (bolsa de IC PIBIC/IBU 102555/2011-7).

8. Referências bibliográficas

ADAMS, M.E. Agatoxines. *Toxicon*, v. 43, p. 509-525, 2004.

ASOODEH, A.; ZARDINI, H. Z.; CHAMANI, J. Identification and characterization of two novel antimicrobial peptides, temporin-Ra and temporin-Rb, from skin secretions of the marsh frog (*Rana ridibunda*). *J Pept Sci*. doi: 10.1002/psc.1409, 29 Sep. 2011.

BOWMAN, C.L. et al. Mechanosensitive ion channels and the peptide inhibitor GsMTx-4: History, properties, mechanisms and pharmacology. *Toxicon*, v. 49, n. 2, p. 249-270, 2007.

BODE F.; SACHS, F.; FRANZ, M. R. Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature*, n. 409, p. 35-36, 2001.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, n. 72, p. 248-274, 1976.
- BUDNIK, B. A. et al. De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolfspider *Lycosa Singoriensis*. *J Mass Spectrometry*, n. 39, p. 193-201, 2003.
- BULET, P. Strategies for the discovery, isolation, and characterization of natural bioactive peptides from the immune system of invertebrates. *Methods Mol Biol.*, n. 494, p. 9-29, 2008.
- COHEN, L. et al. Drosomycin, an innate immunity peptide of *Drosophila melanogaster*, interacts with the fly voltage-gated sodium channel. *J. Biol. Chem.*, n. 35, p. 23558-63, 2009.
- CORZO, G.; ESCOUBAS, P. Pharmacologically active spider peptide toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 60, p. 2409-2426, 2003.
- CORZO, G. et al. Oxyopinins, Large Amphipathic Peptides Isolated from the Venom of the Wolf Spider *Oxyopes kitabensis* with Cytolytic Properties and Positive Insecticidal Cooperativity with Spider Neurotoxins. *Journal of Biological Chemistry*, n. 277, p. 23627-23637, 2002.
- DAI, C. et al. Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*. *Antimicrob Agents Chemother*, n. 11, p. 3967-72, 2008.
- DAFFRE, S. et al. Peptídeos antibióticos: peptídeos antimicrobianos produzidos por aracnídeos. *Biotechnologia, Ciências & Desenvolvimento*, n. 23, p. 48-55, 2001.
- DOYLE, D. A. et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, v. 280, n. 5360, p. 69-77, 3 Apr. 1998.
- ESTRADA, G.; VILLEGAS, E.; CORZO, G. Spider Venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for Cns drugs. *Natural Products Reports*, n. 24, p. 145-161, 2007.
- ESCOUBAS, P.; DIOCHOT, S.; CORZO, G. Structure and pharmacology of spider venom neurotoxins. *Biochimie*, n. 82, p. 893-907, 2000.
- ESCOUBAS, P.; RASH, L. Tarantulas: eight-legged pharmacist and combinatorial chemists. *Toxicon*. v. 43, n. 5, p. 555-574, 2004.

- ESCOUBAS, P.; SOLLID, B. L.; KING, G. F. Venom landscapes: mining the complexity of spider venoms via a combined cDNA and mass spectrometric approach. *Toxicon*, n. 47, p. 650-663, 2006.
- FITCHES, E. et al. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *J Insect Physiol*, n. 50, p. 61-71, 2004.
- FRY, B. G. et al. The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, n. 10, p. 483-511, 2009.
- GAO, B.; TIAN, C.; ZHU, S. Inducible antibacterial response of scorpion venom gland. *Peptides*, n. 12, p. 2299-305, 28 Dec. 2007.
- GORDON, Y. J.; ROMANOWSKI, E. G.; McDERMOTT, A. M. A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs. *Curr. Eye Res.* v. 30, n. 7, p. 505-515, 2005.
- GUHARAY, F.; SACHS, F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol.* n. 352, p. 685-701, Jul. 1984.
- HAEBERLI, S. et al. Characterisation of antibacterial activity of peptides isolated from the venom of the spider *Cupiennius salei* (Araneae: Ctenidae). *Toxicon*, n. 38, p. 373-380, Mar. 2000.
- HERZIG, V. et al. ArachnoServer 2.0: an updated online resource for spider toxin sequences and structures. *Nucleic. Acids. Res.* n. 39, p. 653-657, 2011. doi: 10.1093/nar/gkq1058.
- ITAGAKI, Y. et al. Detection of new spider toxins from a *Nephilengys borbonica* venom gland using on-line mu-column HPLC continuous flow (FRIT) FAB LC/MS and MS/MS. *Nat. Toxins*, n. 5, p. 1-13, 1997.
- JUNG, E. H. et al. Molecular cloning of two cDNAs encoding an insecticidal toxin from the spider, *Araneus ventricosus*, and construction of a recombinant baculovirus expressing a spider toxin. *Int. J. Indust. Entomol.* n. 4, p. 43-49, 2002.
- KING, G. F. et al. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon*, n. 52, p. 264-276, 2008.
- KHAN, S. A. et al. Spider venom toxin protects plants from insect attack. *Transgenic Res*, n. 15, p. 349-357, 2006.

- KOZLOV, S. A. et al. Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider *Lachesana tarabaei* (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity. *Journal of Biological Chemistry*, n. 281, p. 20983-209992, 2006.
- KUHN-NENTWIG, L.; STÖCKLIN, R.; NENTWIG, W. Venom composition and strategies in spiders: is everything possible? *Advances in Insect Physiology*, v. 40, p. 1-86, 2011.
- KUHN-NENTWIG, L.; SCHALLER, J.; NENTWIG, W. Biochemistry, toxicology and ecology of the venom of the spider *Cupiennius salei* (Ctenidae). *Toxicon*, n. 43, p. 543-553, 2004.
- MacKINNON, R. et al. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science*, n. 5360, p. 106-9, 1998.
- MANGONI, M. L. et al. Structure-function relationships in bombinins H, antimicrobial peptides from *Bombina* skin secretions. *Peptides*, n. 11, p. 1673-9, 2000.
- MAZZUCA, M. et al. A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms. *Nat Neurosci.*, n. 10, p. 943-945, 2007.
- MELLOR, I. R.; USHERWOOD, P. N. Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins. *Toxicon*, n. 43, p. 493-508, 2004.
- NUNES, K. P. et al. Tx2-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function. *Toxicon*, n. 51, p. 1197-1206, 2008.
- NGUYEN, L. T.; HANEY, E. F.; VOGEL, H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* n. 9, p. 464-72, 2011.
- PALMA, M. S. A natural combinatorial chemistry strategy in acylpolyamines toxins. *Toxin Reviews*, n. 24, p. 209-234, 2005.
- PALMA, M. S. et al. Mass spectrometric structure determination of spider toxins: arginine-containing acylpolyamines from venoms of Brazilian garden spider *Nephilengys cruentata*. *Natural Toxins*, n. 5, p. 47-57, 1997.
- PLATNICK, N. I. *The World Spider Catalog: version 10.0*. New York: American Museum of Natural History, 2012. Disponível em: <<http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/>>.
- REDAELLI, E. et al. Target Promiscuity and Heterogeneous Effects of Tarantula Venom Peptides Affecting Na⁺ and K⁺ Ion Channels. *J. Biol. Chem.* n. 285, p. 4130-4142, 2010.

- SANG, Y.; BLECHA, F. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Anim Health Res Rev.* v. 9, n. 2, p. 227-35, 2008.
- SILVA JR., P.I. ; DAFFRE, S. ; BULET, P. J. Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *Biochem. Chem.* n. 275, p. 33464-33470, 2000.
- TEDFORD, H. W. et al. Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. *Toxicon*, n. 43, p. 601-618, 2004.
- USHKARYOV, Y. A.; VOLYNSKI, K. E.; ASHTON, A. C. The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies. *Toxicon*, n. 43, p. 527-542, 2004
- VASSILEVSKI, A. A.; KOZLOV, S. A.; GRISHIN, E. V. Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry*, v. 74, n. 13, p. 1505-1534, 2009.
- VILLEGAS, E.; CORZO, G. Pore-forming peptides from spiders. *Toxin Reviews*, n. 24, p. 347-359, 2005.
- WALSH, C. Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol.* n. 1, p. 65-70, 2003.
- YAN, L.; ADAMS, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 4, p. 2059-2066, 1998.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance *Pharmacological Reviews*, v. 55, n. 1, p. 27-55, 2003.

Categoria Jovem Pesquisador

1º Lugar

VACINAÇÃO COM VÍRUS INFLUENZA E
ADENOVÍRUS RECOMBINANTES É CAPAZ DE
PROMOVER POTENTE RESPOSTA IMUNOLÓGICA
E PROTEÇÃO CONTRA DOENÇA DE CHAGAS

Autor: Rafael Polidoro Alves Barbosa, 27 anos, doutorando em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

País: Brasil

Vacinação com vírus *influenza* e adenovírus recombinantes é capaz de promover potente resposta imunológica e proteção contra doença de Chagas

Resumo

Mesmo um século após sua descrição, a doença de Chagas ainda constitui importante problema de saúde pública, sobretudo em países em desenvolvimento. É causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e prevalente na América Latina. Seu tratamento é restrito à fase aguda da doença, causando ainda efeitos adversos. Atualmente não há vacinas contra a doença de Chagas para humanos, portanto o estudo e o desenvolvimento de um protocolo otimizado de vacinação constituem uma linha de pesquisa relevante. Nesse contexto, vírus recombinantes apresentam-se como ferramentas interessantes para combinação em protocolos heterólogos de vacinação de indução e reforço da resposta imune. Utilizando técnicas de genética reversa, construímos vírus *influenza* recombinantes carreando porções da proteína ASP-2 de *T. cruzi*, que foram caracterizados genotípica e fenotipicamente. Na avaliação experimental em animais, os vírus *influenza* recombinantes foram capazes de estimular linfócitos efetores T CD8 específicos e polifuncionais quando combinados com adenovírus recombinantes carreando o segmento ASP2 em protocolo de vacinação sequencial. Além disso, o número de células específicas induzidas pela vacinação foi maior do que o controle positivo, resultando na proteção diferencial de camundongos suscetíveis desafiados via intraperitoneal com parasitos da cepa Y de *T. cruzi*.

Palavras-chave: Vírus recombinantes; doença de Chagas; vacinas recombinantes (PT). Virus recombinantes; La enfermedad de Chagas; vacunas recombinantes (ES)

Agradecimento

Agradeço aos meus orientadores Dr. Alexandre Vieira Machado e Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli, a meus colegas dos laboratórios de Imunoparasitologia e Imunopatologia e outros colaboradores deste projeto, em especial Bruno Galvão, Luara Isabela, Policarpo Sales-Jr e Drs. Maurício Martins Rodrigues e Oscar Bruña-Romero. Também à Fiocruz-MG, Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Vacinas e às agências CNPq, FAPEMIG e ao Ministério da Saúde.

Introdução

Mais de cem anos após sua descrição, a doença de Chagas continua a ser um importante problema de saúde pública, sobretudo na América Latina, embora atualmente seja encontrada em outros continentes. De acordo com a OMS, em 2008 foi estimado em cerca de dez mil o número de mortes em meio a mais de dez milhões de indivíduos infectados pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2009). Seu tratamento é restrito à fase aguda, quando a doença frequentemente apresenta sintomas comuns, tais como febre ou fadiga, dificultando o diagnóstico adequado e os procedimentos terapêuticos (PARADA et al., 1997). Foi demonstrado recentemente que, do ponto de vista econômico, é interessante o desenvolvimento de uma vacina contra a doença de Chagas na América Latina, mesmo em regiões de baixo risco de infecção e baixa eficiência vacinal (LEE et al., 2010).

A resposta imunológica protetora contra a infecção pelo *T. cruzi* tem como principal agente as células T CD8 (RODRIGUES et al., 2003). Os mecanismos efetores utilizados por estas células para controlar os parasitas vão desde a eliminação direta das células infectadas à secreção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ (MULLER et al., 2003). A resposta CD8 é diretamente relacionada à imunodominância, na qual podemos encontrar competição na apresentação de antígenos, o que restringiria a população específica CD8 que seria ativada (RODRIGUES et al., 2008; DE ALENCAR et al., 2009). Células T CD8 contra a Proteína de Superfície Amastigota (ASP2) foram detectadas no soro de pacientes infectados na fase crônica, um indicador de sua importância imunológica (PAN; McMAHON-PRATT, 1989). Assim, inúmeros grupos testaram – e testam – epítomos ou a proteína ASP2 completa, com resultados promissores. Entre eles encontramos, em diferentes linhagens de camundongos, o uso de

proteína recombinante, vacina de DNA ou vírus recombinantes expressando epítomos ou a ASP2 (DE ALENCAR et al., 2009; BOSCARDIN et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2004; MACHADO et al., 2006).

Vírus recombinantes são ferramentas promissoras como vetores vacinais para doenças infecciosas. Entre eles, os vírus influenza são reconhecidamente bons indutores de linfócitos T CD8 citotóxicos (CTLs) por infecção direta de células dendríticas imaturas e monócitos, facilitando a apresentação antigênica (COX; BROKSTAD; OGRA, 2004; EFFERSON et al., 2003; CELLA et al., 2000). Ademais, o número de proteínas (12) dos vírus influenza é relativamente pequeno em comparação com outros vetores virais – um fator que limita a diversidade da apresentação de antígeno (CELLA et al., 2000; SCHIRMBECK et al., 2008). Além disso, a factibilidade de gerar vírus influenza recombinantes pela técnica de genética reversa faz deles alvos atraentes de estudos de vetores para doenças mediadas por protozoários (KIRALY; KOSTOLANSKY, 2009; NEUMANN; KAWAOKA, 2004).

Recentemente, nosso grupo demonstrou em camundongos que os vírus influenza recombinantes na proteína neuraminidase (NA), carreando também um gene de *Toxoplasma gondii*, são capazes de reduzir a carga parasitária por induzir resposta imune humoral e celular específica para toxoplasmose quando usados em combinação com adenovírus recombinantes humano do tipo 5 carreando o mesmo gene (MACHADO et al., 2010). Com base nessa constatação, dividimos a proteína ASP2 em três segmentos – N-terminal, medial e C-terminal – e geramos vírus influenza carreando os dois últimos segmentos que contêm porções imunodominantes conhecidas. Para testar a imunodominância, utilizamos os vírus influenza recombinantes como primeira imunização (prime), e adenovírus carreando a ASP2 completa (AdASP2) como imunização de reforço (boost) em duas linhagens de camundongos que apresentam diferentes haplótipos de MHC I, conseqüentemente apresentando epítomos diferentes às células T CD8.

Objetivos

Avaliar a capacidade protetora do protocolo heterólogo de imunização, utilizando vírus influenza e adenovírus recombinantes carreando o antígeno ASP2 de *Trypanosoma cruzi* em camundongos. Construir e caracterizar genotípica e fenotipicamente, em cultura celular, vírus influenza recombinantes

carreando a proteína ASP-2 de *Trypanosoma cruzi*. Avaliar a resposta imune heteroespecífica humoral e celular em camundongos imunizados com vírus influenza e adenovírus recombinantes para ASP-2. Determinar a proteção *in vivo* em animais vacinados com influenza e adenovírus carreando antígenos da proteína ASP-2 frente ao desafio com parasitos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

Material e métodos

Camundongos

Camundongos das linhagens C57BL/6 e C3H/He, machos de 8 a 12 semanas de idade, foram adquiridos no Biotério de Produção (BIOT) do Centro de Pesquisas René Rachou e no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fiocruz-RJ, e mantidos de acordo com recomendações de padrão institucional (Licença do CEUA LW9-09).

Células e parasitos

Células MDCK foram cultivadas a 37°C em ambiente úmido contendo 5% de CO₂. As células foram cultivadas em meio Dulbecco Eagle Modificado completo (DMEM, Sigma), contendo 1mm de piruvato de sódio, 4,5mg/ml de L-glicose, 100U/ml de penicilina e 100mg/ml de estreptomina, suplementado com 5% (MDCK) ou 10% (293T) de soro fetal bovino (SFB, CUTILAB). Os desafios infecciosos foram efetuados por meio da inoculação de 500 (C3H/He) ou 1000 (C57BL/6) tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi* via intraperitoneal. A sobrevivência foi monitorada diariamente e a parasitemia foi mensurada por meio da contagem dos parasitos em 5µl de sangue fresco retirado da veia caudal (BRENER, 1962).

Construção dos plasmídeos de transferência

A construção dos plasmídeos de transferência foi realizada como descrito anteriormente (MACHADO et al., 2010). O plasmídeo recombinante da ASP2 foi obtido como descrito (BOSCARDIN, 2003). A sequência codificadora do polipeptídeo ASP2 foi dividida em três porções (Fig. 1) que, adicionadas da sequência IgSP, foram inseridas em orientação negativa entre

os sítios reconhecidos pelas enzimas XhoI e NheI do plasmídeo duplicado da neuraminidase (NA) do vírus influenza pPRNA38. Os plasmídeos resultantes foram denominados: pPR-NA38-ASP2-M-ASP2 e pPR-NA38-ASP2-C-ASP2 (Fig. 2).

Figura 1. Sequência da proteína ASP2 do *T. cruzi*, mostrando a divisão em três partes para recombinação com o segmento da neuraminidase do vírus influenza. Na figura, podemos ver os epítomos protetores e qual haplótipo de MHC I de camundongo o apresenta adequadamente.

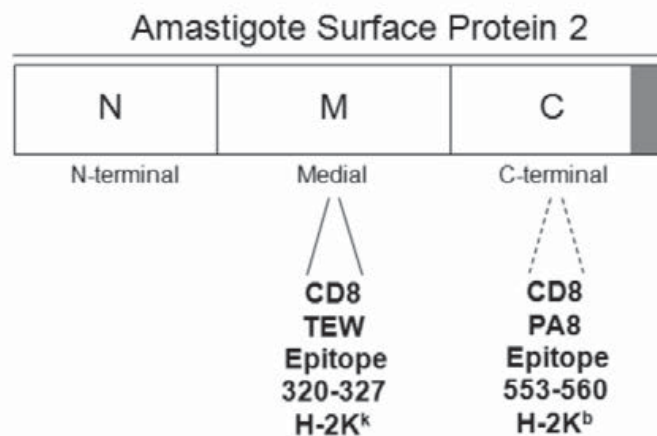
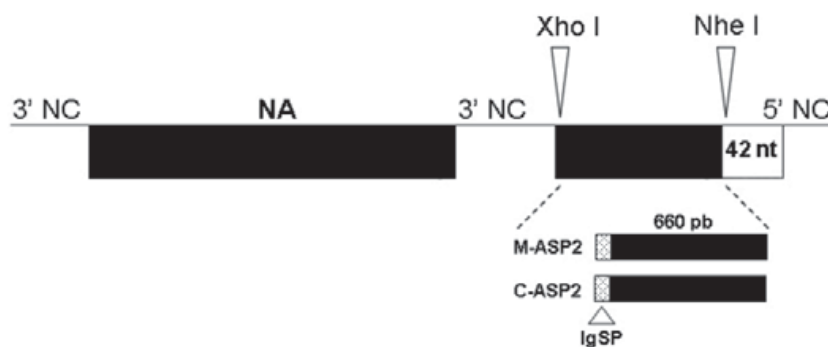


Figura 2. Representação esquemática dos plasmídeos recombinantes de transferência. Os insertos foram divididos para o tamanho de 660 pares de base, uma vez que um inserto maior compromete a estabilidade genética dos vírus recombinantes (MACHADO et al., 2003).



Peptídeos

Os peptídeos VNHRFTLV e TEWETGQI foram adquiridos da empresa Genscript (Piscataway, NJ). A pureza determinada foi superior a 90%. Suas identidades foram confirmadas por Q-TOF Micro, equipado com fonte de ionização eletrospray (Micromass, United Kingdom).

Obtenção dos vírus influenza recombinantes por genética reversa

Os vírus influenza foram obtidos por genética reversa, conforme Machado e colaboradores (MACHADO et al., 2006b). Na referida transfecção, foram utilizados os plasmídeos de transferência, codificando o segmento selvagem (pPR-NA) ou recombinante da NA (pPR-NA38-ASP2-M-ASP2 e pPR-NA38-ASP2-C-ASP2), bem como aqueles que codificam os demais sete segmentos do vírus influenza (pPoLi-PB1, pPoLi-PB2, pPoLi-PA, pPoLi-NP, pPoLi-M, pPoLi-NS e pPoLi-HA). Os vírus influenza utilizados como controle negativo, denominados vNA38-SAG2 (aqui identificados como Flu-CT), foram obtidos e amplificados como descrito por Machado e colaboradores em 2010 (MACHADO, 2010). Os adenovírus recombinantes carregando a proteína ASP2 e SAG-2 (controle negativo), sob a sequência promotora da β -galactosidase da *Escherichia coli*, bem como detalhes dos estudos de geração e purificação dos vírus foram obtidos como descrito anteriormente (MACHADO et al., 2006; BRUNA-ROMERO et al., 1997; CAETANO et al., 2006).

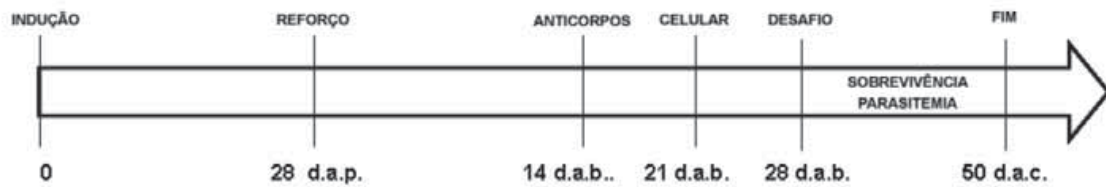
Extração de RNA viral e confirmação por PCR-Transcriptase Reversa

O RNA viral dos estoques de trabalho foi extraído de células MDCK infectadas como descrito anteriormente (MACHADO et al., 2006). Os segmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 1% e visualizados com corante brometo de etídio.

Imunizações

As imunizações seguiram o esquema apresentado a seguir, tendo como imunizações de indução (prime), no protocolo homólogo adenovírus recombinantes carregando ASP2 (Ad-ASP2) ou adenovírus controle (Ad-CT). No protocolo heterólogo, a indução deu-se com vírus influenza recombinantes carregando as porções M-ASP2(Flu-M-ASP2) ou C-ASP2

(Flu-C-ASP2) ou controle (Flu-CT). Como reforço (boost), todos receberam Ad-ASP2 ou Ad-CT (Tabela 1). Um grupo recebeu apenas uma dose de Ad-ASP2, com o objetivo de identificar a necessidade da segunda dose para induzir boa resposta imune.



Esquema representativo das imunizações, experimento e tempos utilizados no presente trabalho. As imunizações com influenza recombinantes foram dadas via intranasal com 1×10^3 PFU de vírus a camundongos desanestesiados por anestesia (ketamina/xilazina). As imunizações com adenovírus recombinantes foram dadas com 5×10^7 PFU de vírus administrados na base da cauda, de forma subcutânea.

- Legendas: d.a.p. – dias após primeira imunização
d.a.b. – dias após a segunda imunização
d.a.c. – dias após o desafio

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e Western Blot

O sangue dos camundongos imunizados foi coletado através do plexo orbital 14 dias após a imunização de reforço. Anticorpos contra a proteína ASP-2 foram detectados por ELISA, como descrito anteriormente (GIRALDO et al., 2000).

Para o Western Blot, $0,5 \mu\text{g}$ da proteína recombinante ASP2, ou His65KDa, foi adicionado a gel de poliácridamida 12% e transferido em seguida para membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com PBS-Tween contendo soro fetal bovino (CUTILAB) e divididas para incubação com o soro individual dos animais vacinados. Após lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo (SIGMA), e a presença de anticorpo específico foi revelada por meio de filmes de raio-X após uma reação padrão de quimioluminescência (ECL Detection System, AmershamBiosciences).

Para medir a produção de IFN- γ , os esplenócitos foram obtidos e incubados por 72 horas em 5% CO₂. A concentração foi determinada em sobrenadante de culturas sob estimulação, utilizando o kit DuoSet (ELISA Development System mouse IFN- γ kit, R&D Systems), de acordo com as recomendações do fabricante.

The Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISPOT)

Três semanas após a imunização de reforço, os camundongos foram eutanasiados e o baço foi retirado. O número de células T específicas para ASP2 foi determinado pela técnica de ELISPOT, como descrito anteriormente (MACHADO et al., 2006). A viabilidade das células foi avaliada utilizando exclusão por azul de tripan 0,2%. O número de esplenócitos foi então ajustado para 1x10⁶ células por poço contendo meio de cultura na presença ou ausência dos peptídeos específicos imunodominantes, na concentração de 10 g/ml de VNHRFTLV (aa 553-560, quando esplenócitos de C57BL/6) ou TEWETGQI (aa 320-327, quando esplenócitos de C3H/He). Os spots foram contados por meio de um software denominado S5 Core ELISPOT Analyser.

Perfil fenotípico por Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)

Para marcações intracelulares, as células foram ajustadas para 1x10⁶ por poço em meio de cultura contendo GolgiStopTM e GolgiPlugTM, de acordo com instruções dos fabricantes (BD Pharmigen). Em 50% das culturas, foi adicionada uma concentração final de 10 μ g/ml de TEWETGQI (aminoácidos 320-327; C3H/He) na presença do anticorpo anti-CD107a PE (BD Biosciences). Após 12 horas de incubação, as células foram marcadas com dextrâmero TEWETGQI marcado com anticorpos fluoresceína isotiocianato-FITC (Immudex, Dinamarca); dez minutos depois, com anti-CD8-complexo clorofila peridina (PerCP), ou ficoeritrina Cy7 (PeCy7) anti-CD8, ou anti-CD3-FITC (em análises sem o dextrâmero). As células foram então fixadas e permeabilizadas utilizando o kit Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences). Por fim, foram marcadas para citocinas intra-celulares aloficocianina (APC)-anti-IFN- γ e APC-cy7 anti-TNF- α , e fixadas em paraformaldeído. E foram adquiridos pelo menos cem mil eventos em citômetros de fluxo FacsCanto, LSRFortessa ou FacsAria II (BD, Biosciences), analisados utilizando o software FlowJo (ThreeStars).

Análises estatísticas dos dados

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism v5.0. Para a comparação entre os grupos nos resultados de ELISA, ELISPOT e FACS, foi utilizado o teste de Tukey, na análise “One-Way Anova”. Para análise da parasitemia, foi realizado o teste de Bonferoni, também dentro da análise “Anova”. O teste de “LogRank” foi utilizado para comparar a sobrevivência dos camundongos após o desafio com *T. cruzi*.

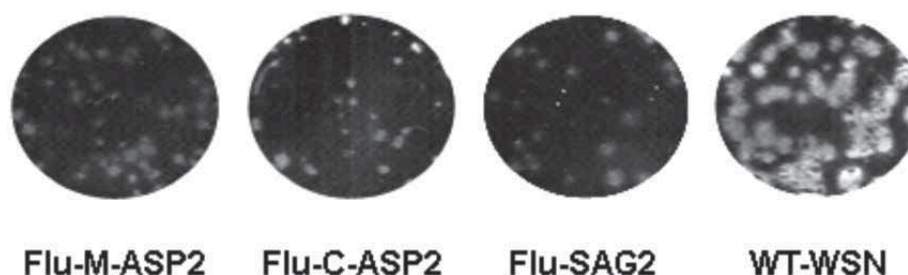
Resultados da pesquisa e discussão

Produção dos vírus influenza recombinantes por genética reversa

Os clones de vírus influenza H1N1 A/WSN/33 recombinantes carregando o segmento dicistrônico da neuraminidase contendo, além da sequência da NA, as sequências gênicas que expressam as porções medial e C-terminal da proteína de superfície amastigota 2 (ASP2) do *Trypanosoma cruzi*, denominados respectivamente Flu-M-ASP2 e Flu-C-ASP2, foram gerados utilizando a técnica de transfecção por 12 plasmídeos, conforme previamente descrito por Fodore e colaboradores (FODOR et al., 1999). Após uma etapa de amplificação, seguiu-se a titulação de primeira e segunda clonagens. Foram observadas placas de lise, das quais clones foram selecionados, obtendo-se então o estoque de trabalho e a caracterização fenotípica. O fenótipo consistiu em placas de lise menores do que aquelas obtidas após a infecção com o vírus selvagem (vNA) em células MDCK (Fig. 3). Em todas as passagens, o título dos vírus recombinantes obtidos foi inferior ao do vírus selvagem em pelo menos um \log_{10} .

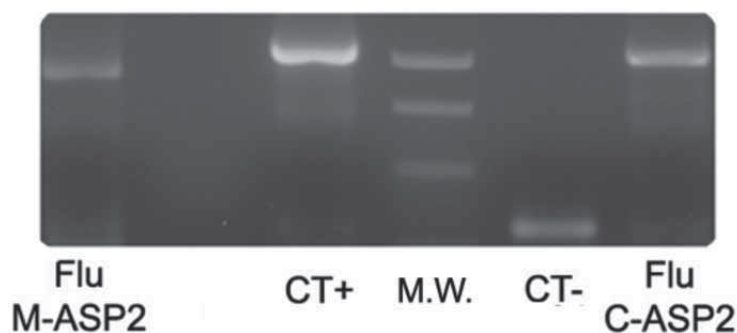
Tais resultados são explicados com base no fato de que a inserção de um inserto heterólogo na neuraminidase pode afetar o desempenho replicativo viral, uma vez que ela é responsável pela liberação dos vírus das células (MACHADO et al., 2006b).

Figura 3. Caracterização fenotípica dos vírus influenza recombinantes gerados por genética reversa. A contagem da titulação resulta em Unidade Formadora de Placa de lise (PFU).



Os RNAs virais foram extraídos e amplificados por RT-PCR, e depois visualizados em gel de agarose, para confirmação dos tamanhos dos insertos recombinantes M-ASP2 e C-ASP2, para comparação com o plasmídeo controle positivo (pPRNA38-M-ASP2, do mesmo tamanho dos insertos) ou negativo (RNA extraído do vírus selvagem vNA). Como mostra a Figura 4, os insertos foram do tamanho esperado, e análises de sequenciamento dos estoques virais utilizados no trabalho confirmaram a ausência de mutações que pudessem alterar as estruturas proteicas inseridas (dados não mostrados).

Figura 4. Gel de agarose corado com brometo de etídio, visualizado sob fluorescência, contendo os cDNAs obtidos por RT-PCR dos extratos de RNA viral e plasmídeo controle.



Legenda: CT+ – controle positivo
CT- – controle negativo
MW – marcador de peso molecular

Análise da indução da produção de imunoglobulinas específicas

A presença de anticorpos específicos anti-ASP2 foi detectada pela técnica de ELISA e Western Blot no soro dos camundongos obtido 14 dias após a imunização de reforço. Os resultados apresentados na Figura 5 demonstram que o nível de anticorpos anti-ASP2 foi significativamente maior nos camundongos C57BL/6 imunizados no protocolo heterólogo Flu-C-ASP2/AdASP2 em comparação ao controle FluCT/AdCT (canaletas 4 a 6). Além disso, os níveis de imunoglobulinas específicas aumentaram de forma significativa em relação ao grupo de animais que receberam uma única imunização com AdASP2 (canaleta 11). Na Figura 6, podemos notar que há uma resposta humoral difusa nos animais C3H/He imunizados com antígenos da ASP2, mas nenhum grupo apresentou anticorpos específicos em quantidade significativa em comparação aos controles negativos.

Figura 5. Resposta humoral de soro individual de camundongos C57BL/6 vacinados com vírus recombinantes.

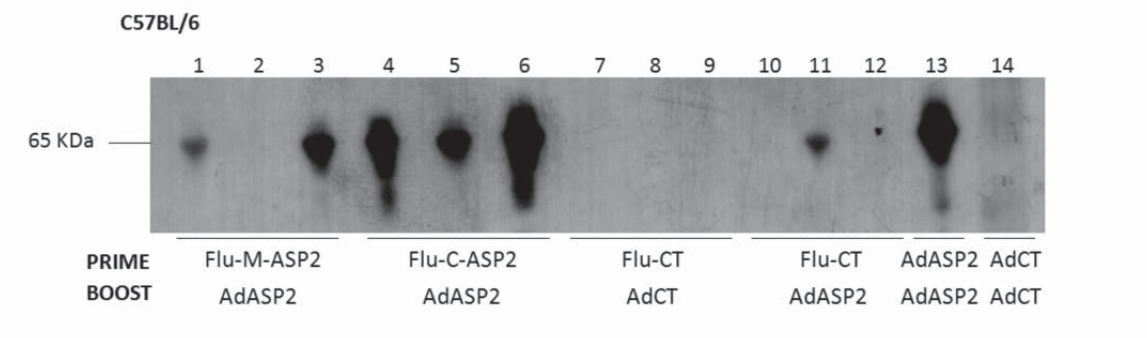
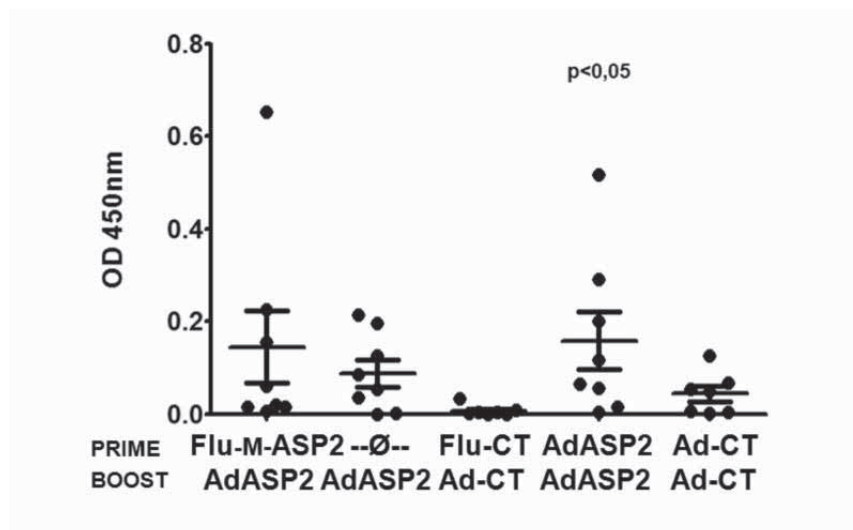


Figura 6. Resposta imune humoral presente no soro de camundongos C3H imunizados contra a proteína recombinante ASP2 (rASP2).

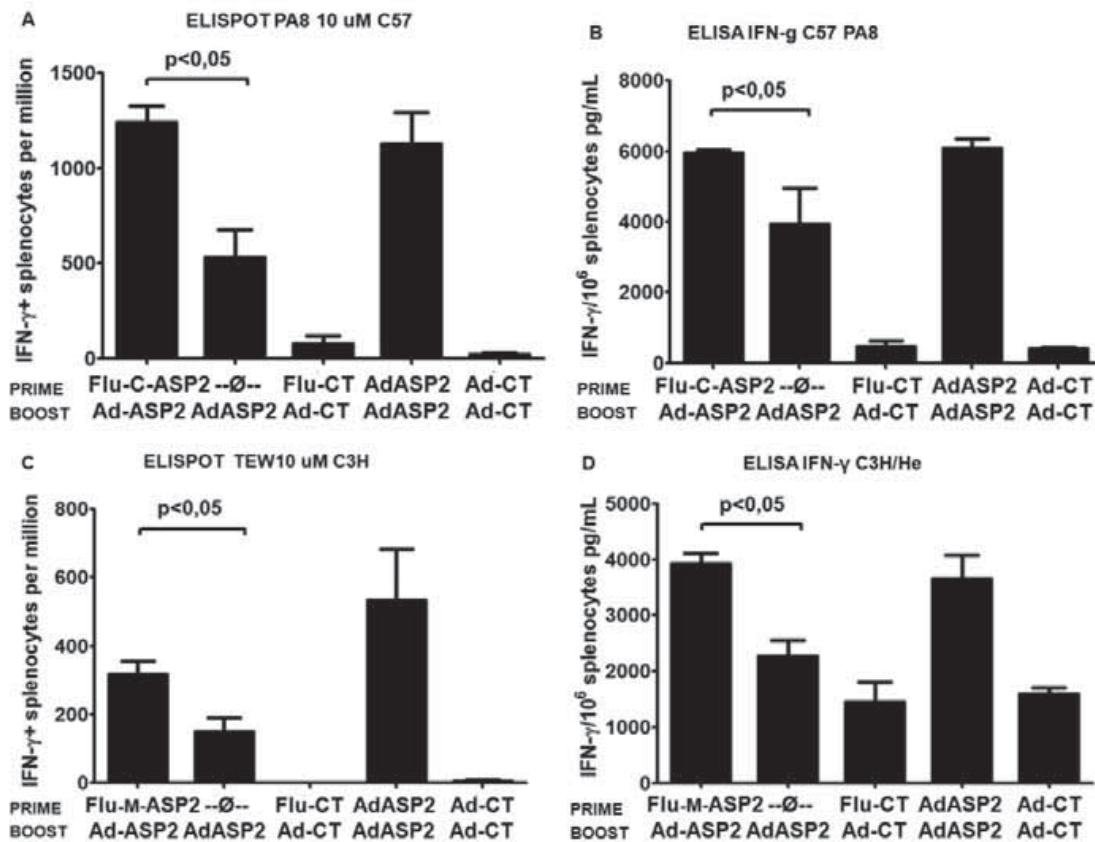


É importante ressaltar que a forma infectiva que apresenta a proteína ASP2 no *Trypanosoma cruzi* é amastigota, que é uma forma intracelular; assim, a eficácia dos anticorpos contra essa fase do ciclo de vida do parasito não é significativa. Como demonstrado anteriormente, também seria esperado que apenas a porção C-ASP2 fosse capaz de estimular a promoção adequada de anticorpos, uma vez que é onde se encontra o epítipo B no animal C57BL/6 (ARAÚJO et al., 2005).

Análise de resposta imune celular específica anti-ASP2

A capacidade do protocolo heterólogo de indução e reforço da resposta imune para induzir uma resposta imune celular específica para ASP2 foi demonstrada pela técnica de ELISPOT, como descrito no item 3 (materiais e métodos). Resumidamente, esplenócitos dos camundongos imunizados foram obtidos três semanas após a imunização de reforço e estimulados *ex vivo* com o epítipo imunodominante VNHRFTLV (PA8) presente apenas na porção carbóxi-terminal da proteína ASP2 (C-ASP2), quando apresentado no haplótipo de MHC de classe I H2K^b, presente na linhagem de camundongos C57BL/6. No caso dos camundongos da linhagem C3H/He, o epítipo utilizado foi o TEWETGQI (TEW). Como demonstrado nas Figuras 7A e 7C, um aumento significativo no número de células T produtoras de IFN- γ específicas para PA8 pôde ser visto nos grupos primoimunizados com os vírus influenza recombinantes carreando a porção carboxiterminal da proteína ASP2, seguido de imunização de reforço com AdASP2, ou no grupo que recebeu duas imunizações com AdASP2. É importante ressaltar que apenas uma imunização com AdASP2 foi suficiente para induzir alta quantidade de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ específicas para o epítipo PA8, embora nos grupos citados tenha ocorrido um aumento significativo do número de células específicas. Todos os grupos que receberam pelo menos uma imunização com AdASP2 estimularam um número significativo de células T CD8 produtoras de IFN- γ em relação aos grupos imunizados com os vírus controles (Fig. 7A e 7B). No caso dos animais C3H/He, todos os grupos primoimunizados com influenza apresentaram maior resposta celular em comparação com apenas uma dose de AdASP2, e significativa em relação aos controles negativos (Fig. 7C e 7D).

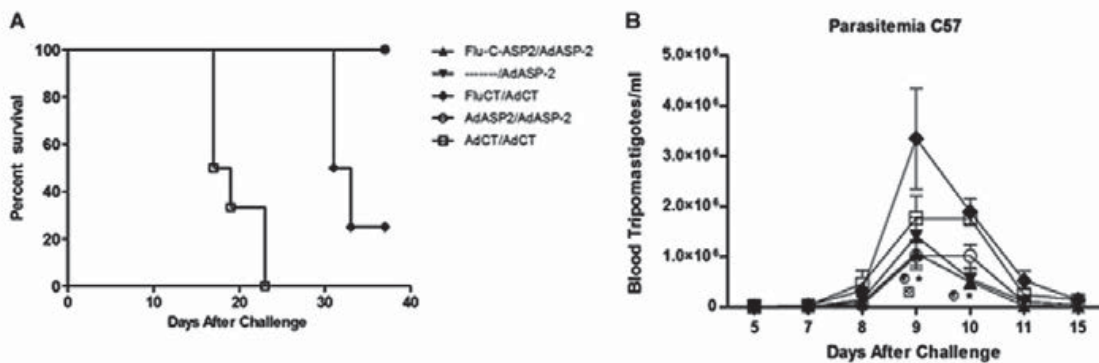
Figura 7. Resposta imunológica celular de camundongos imunizados com vírus recombinantes dada em esplenócitos por milhão (A e C) ou picogramas por ml (B e D). n= 8



Ensaio de proteção em camundongos imunizados

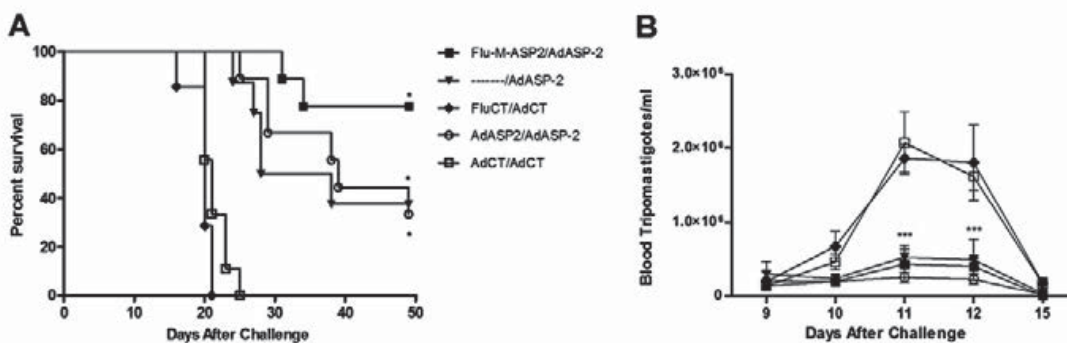
Os resultados apresentados na Figura 8 mostram que respostas imunológicas induzidas pela vacinação com os protocolos de imunização com os vírus recombinantes foram capazes de reduzir a carga parasitária de forma significativa em relação aos controles no pico parasitário (dia 9) e no primeiro dia de queda (dia 10). Além disso, com uma única exceção, os camundongos dos grupos controles morreram, como mostra a Figura 8A. Fica evidente que a resposta imunológica induzida por apenas uma imunização com Ad-ASP2 é capaz de proteger os camundongos desafiados, visto que todos os grupos que receberam uma imunização com esse vírus apresentaram proteção significativa em relação aos grupos imunizados com os vírus controles ($p < 0,001$).

Figura 8. Ensaios de proteção em camundongos C57BL/6 imunizados.



Para testar as diferenças na proteção entre os diferentes protocolos vacinais, utilizamos a linhagem de camundongos suscetível à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* – C3H/He –, na qual fica evidenciada a diferença da resposta imune entre os grupos. Todos os grupos imunizados com pelo menos uma dose de Ad-ASP2 foram capazes de controlar a parasitemia no pico, como mostra a Figura 9B. Porém, quando se observa a mortalidade, a resposta imunológica induzida apenas nos animais imunizados com vírus influenza carreando a porção da proteína ASP2 que contém o epítipo imunodominante para o haplótipo H-2K conseguiu obter, além de um atraso na mortalidade, uma redução significativa em comparação com o grupo imunizado com uma dose de Ad-ASP2 (n=9; Fig. 9A).

Figura 9. Ensaios de proteção em uma linhagem de camundongo suscetível a C3H/He.



Perfil fenotípico das células CD8 efetoras

Uma vez que a produção de anticorpos ou IFN- γ medidos por ELISA ou ELISPOT não foram capazes de explicar a diferença observada na proteção dos animais C3H/He, a etapa seguinte do nosso trabalho consistiu em um aprofundamento da análise do perfil das células CD8 específicas ativadas pela vacinação. Todos os experimentos de aprofundamento foram realizados no modelo suscetível C3H/He.

Na análise de polifuncionalidade de produção de IFN- γ , TNF- α e na mobilização do marcador CD107a, o perfil entre os grupos vacinais foi muito parecido com o ELISPOT (Fig. 10). Além disso, essa resposta mostrou-se protetora em tempo de sobrevivência e menor mortalidade de todos os grupos na comparação com os controles negativos (Fig. 9), o que demonstra sua importância.

Figura 10. Perfil fenotípico indireto sob estimulação com peptídeo TEWETGQI.

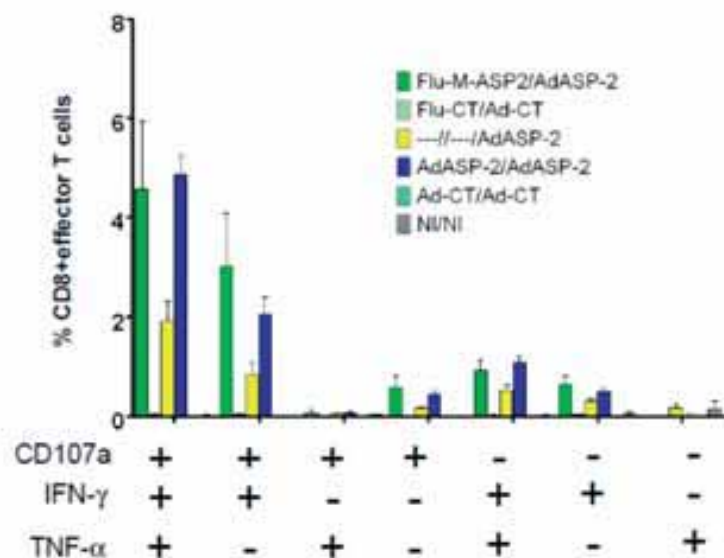
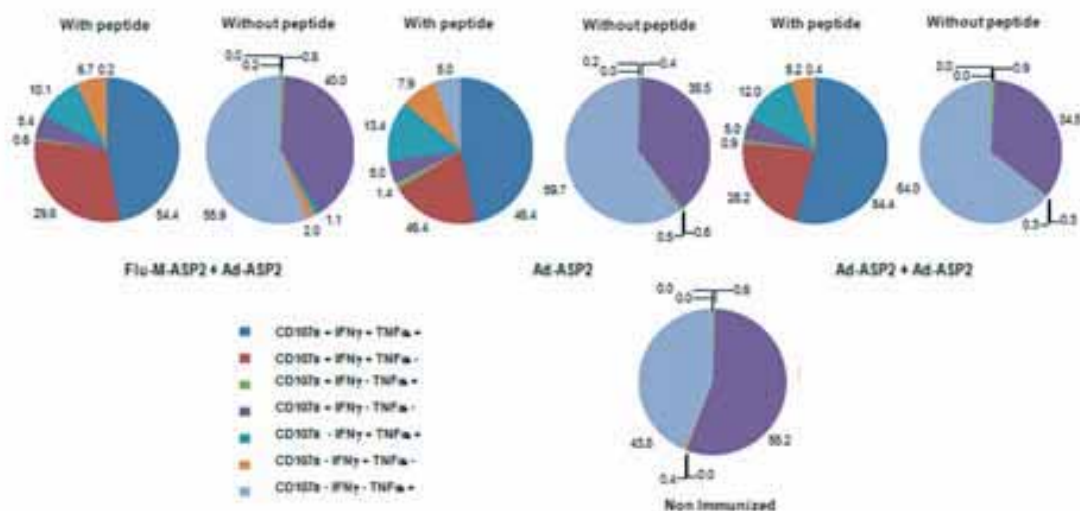


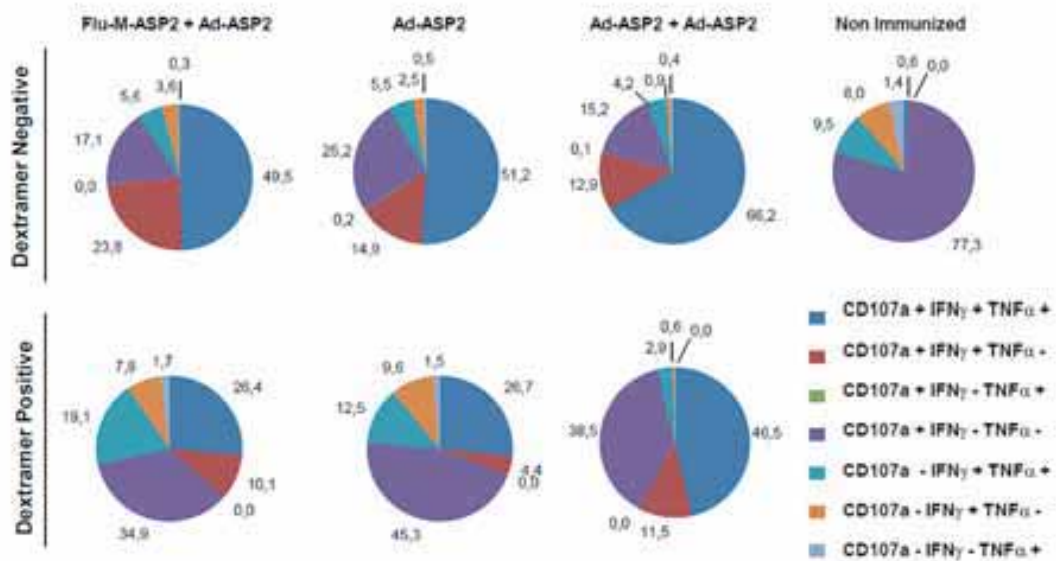
Figura 11. Demonstração gráfica da porcentagem de células com perfil efetor (apresentando pelo menos um dos três parâmetros analisados), antes e depois da estimulação com o peptídeo, mostrando a reação específica que eventualmente ocorre na presença do parasito.



Os experimentos representados nas Figuras 10 e 11 não demonstraram diferenças entre os protocolos que explicasse a diferença na proteção. Ressaltamos aqui que os métodos de estimulação são indiretos: embora o estímulo seja específico, vemos todas as células estimuladas, e não apenas as CD8, nem as imunodominantes, o que reconhecidamente constitui um dos mecanismos de escape do parasito (RODRIGUES et al., 2008; DOMINGUEZ et al., 2011). Assim, o passo seguinte foi a análise geral do perfil específico, utilizando um dextrâmero que ancora o peptídeo CD8 imunodominante TEWETGQI.

Como demonstrado na Figura 12, o perfil percentual induzido pela vacinação com Flu/Ad-ASP2 é muito próximo ao do grupo imunizado com Ad-ASP2, comprovando a nossa hipótese de que, por si mesmo, provavelmente o influenza exerce pouca influência sobre o perfil de imunodominância, por ter poucas proteínas competindo pela apresentação de antígenos com a proteína heteróloga inserida neles. Uma segunda dose de Ad-ASP2, no grupo Ad-ASP2/Ad-ASP2, muda o perfil para um mais inflamatório e menos imunomodulatório, caracterizado por maior indução de células efetoras produtoras de TNF- α . Notadamente, os adenovírus recombinantes são os maiores indutores de TH1 dentre os vetores vacinais, o que explica o fato.

Figura 12. Percentuais de células com perfil efetor dentro de células T CD8+ com ou sem dextrâmero nos diferentes protocolos vacinais ou em animais não imunizados.



Quando a análise do perfil não explica a diferença de sobrevivência entre os animais imunizados uma vez com Ad-ASP2 e os animais imunizados com Flu-M-ASP2/Ad-ASP2, passamos a observar não somente a proteção por perfil, mas a quantidade de células efetoras em cada situação. O resultado é apresentado na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. % de células CD8+ específicas diretas e indiretas presentes em esplenócitos de animais imunizados com vírus recombinantes ou não infectados. Estes resultados foram obtidos por meio de *pool* de esplenócitos dos grupos indicados.

% de CD8 efetoras específicas presente em esplenócitos de animais imunizados com vírus recombinantes								
Immun. Protocol	% total CD8+ T cell Dex. Neg.	% CD8+ T cell Dex. Neg.			% total CD8+ T cell Dex. Pos.	% CD8+ T cell Dex. Pos.		
		CD107+	IFN γ	TNF α		CD107+	IFN γ	TNF α
Flu-ASP2 + Ad-ASP2	89.5	9.9	9.0	6.1	10.5	2.1	1.8	1.3
----- + Ad-ASP2	97.7	5.1	4.1	3.2	2.3	0.5	0.4	0.3
Ad-ASP2 + Ad-ASP2	98.5	11.5	10.3	8.7	1.5	0.6	0.4	0.3
Non infected	99.3	1.1	0.3	0.2	0.7	0.2	0.0	0.0

Detendo-nos um pouco mais na análise da Tabela 1, percebemos que a quantidade percentual de células dextrâmero positivas – ou seja, específicas para o peptídeo imunodominante do T. cruzi TEWETGQI – foi muito maior no protocolo que utilizou os vírus influenza recombinantes, confirmando novamente a nossa hipótese de que a imunodominância observada no inserto preserva-se melhor quando o influenza é utilizado como vetor, em detrimento do adenovírus, uma vez que este compete pela imuno-

dominância (SCHIRMBECK et al., 2008). Inclusive, em se comparando os grupos que receberam uma ou duas doses de Ad-ASP2, a segunda imunização não resultou em aumento da população imunodominante (Tabela 1), e esse resultado corresponde com o gráfico da Figura 9 onde não houve melhora na proteção, salientando assim a importância de se usar vetores diferentes na imunização prime-boost.

Já foi demonstrado que o uso de vírus influenza recombinantes como vetores em protocolos heterólogos de imunização induz respostas imunes protetoras contra doenças infecciosas, tais como malária e toxoplasmose (MACHADO et al., 2010; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, 2003). A capacidade dos vírus influenza de apresentar antígenos heterólogos serve como alternativa a outros vetores no desenvolvimento de uma vacina contra a doença de Chagas, uma vez que já temos um vetor demonstrando resultados positivos – o rAd5 (DE ALENCAR et al., 2009; MACHADO et al., 2006; MIYAHIRA et al., 2005). E mostramos aqui que, em uma linhagem resistente, apenas uma única imunização com AdASP2 foi suficiente para alcançar proteção. Além disso, o uso de adenovírus encontra limitações, tais como imunidade prévia, além de falhar em demonstrar em humanos a mesma proteção verificada em primatas não humanos (ABBINK et al., 2007).

O uso de vírus influenza vivos replicativos pode ser visto como uma alternativa aos vírus adaptados ao frio, que possuem algumas limitações na utilização para vacinação em idosos, ou em função da grande quantidade de vírus necessária para causar proteção (COX; BROKSTAD; OGRA, 2004). Também serviriam como alternativa para vírus influenza truncados na proteína Não Estrutural 1 (NS1), uma vez que seu truncamento pode inibir a indução do sistema imune adaptativo por suprimir a função da célula dendrítica, que é crucial para a proteção em doenças infecciosas (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007). A resposta imune induzida pelos vírus influenza recombinantes dicistrônicos na neuraminidase como prime foi alcançada em baixas doses de vírus (mil vírus por animal), e a resposta gerada com a dose reforço com adenovírus recombinantes foi capaz de proteger camundongos susceptíveis frente à infecção, como visto neste trabalho e em um trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (MACHADO et al., 2010).

A qualidade da resposta imune é um assunto recente na literatura de vacinas, na qual o paradigma em que há a maior produção de IFN- γ já não é considerado a maneira mais adequada de alcançar proteção em algumas doenças infecciosas, como o HIV (KIM et al., 2010; VARADARAJAN

et al., 2011; MASOPUST, 2009). Nosso protocolo de vacinação heterólogo, utilizando Flu-M-ASP2 ou Flu-C-ASP2 como imunização de indução e AdASP2 como reforço, pôde estimular uma grande produção de IFN- γ , porém essa produção não foi diretamente relacionada com proteção no modelo susceptível C3H/He. Os fatores responsáveis pela proteção no grupo imunizado Flu-M-ASP2/AdASP2, que estão ausentes no grupo imunizado AdASP2/AdASP2, provavelmente têm correlação direta com a imunodominância que, como demonstramos, tem alterações em meio aos diferentes grupos de animais vacinados.

Em resumo, conseguimos demonstrar que a imunização usando vírus influenza recombinantes como indução e adenovírus recombinantes humanos do tipo 5 como reforço, ambos carreando antígenos da proteína ASP2, pôde induzir potente resposta imune celular, que foi protetora em infecção experimental com *T. cruzi*. Dessa forma, confirma-se a viabilidade de uso de vírus influenza vivos atenuados como vetores vacinais contra doenças infecciosas.

Conclusões

Neste trabalho, construímos e caracterizamos vírus influenza recombinantes carreando segmentos da proteína de superfície amastigota-2 de *Trypanosoma cruzi*. Esses vírus mostraram-se estáveis e sem mutações em passagens seriadas in vitro, confirmando a factibilidade da técnica de genética reversa.

Além disso, a vacinação sequencial dos vírus influenza via intranasal e adenovírus recombinantes carreando a proteína ASP2 inteira foi capaz de induzir uma boa resposta imunológica celular, reconhecidamente a principal responsável pela proteção em várias doenças infecciosas e, no caso em questão, contra o parasito responsável pela doença de Chagas (RODRIGUES et al., 2003).

Essa resposta celular foi capaz de proteger camundongos altamente suscetíveis contra a infecção por *Trypanosoma cruzi*, em dois experimentos independentes, acima do controle positivo Ad-ASP2/Ad-ASP2 e significativamente acima de uma dose vacinal com Ad-ASP2. No intuito de explicar essa diferença observada entre os protocolos vacinais, percebemos que, além de conseguir induzir boa quantidade de resposta polifuncional, nossos vírus

ainda foram capazes de “preparar” as células imunodominantes específicas apropriadamente para que, na imunização de reforço, uma maior quantidade desse clone de linfócito T se proliferasse e fosse capaz de eliminar a infecção adequadamente.

Este trabalho gerou patentes nacionais e internacionais, que não estão indicadas para não identificar o autor e está em processo de submissão para ser publicado em uma revista “qualis A” internacional.

Referências bibliográficas

ABBINK, P. et al. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol*, v. 81, n. 9, p. 4654-63, 2007.

ARAUJO, A. F. et al. CD8⁺-T-cell-dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein-2. *Infect Immun*, v. 73, n. 9, p. 6017-25, 2005.

BOSCARDIN, S. B. et al. Immunization with cDNA expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. *Infect Immun*, v. 71, n. 5, p. 2744-57, 2003.

BRENER, Z., Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, n. 4, p. 389-96, 1962.

BRUNA-ROMERO, O. et al. Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. *Hepatology*, v. 25, n. 2, p. 470-7, 1997.

CAETANO, B. C. et al. Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Hum Gene Ther*, v. 17, n. 4, p. 415-26, 2006.

CELLA, M. et al. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol*, v. 1, n. 4, p. 305-10, 2000.

COX, R. J.; BROKSTAD, K. A.; OGRA, P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand J Immunol*, v. 59, n. 1, p. 1-15, 2004.

DE ALENCAR, B. C. et al. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4⁺ and CD8⁺ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun*, v. 77, n. 10, p. 4383-95, 2009.

DOMINGUEZ, M. R. et al. Subdominant/cryptic CD8 T cell epitopes contribute to resistance against experimental infection with a human protozoan parasite. *PLoS One*, v. 6, n. 7, p. e22011, 2011.

EFFERSON, C. L. et al. Activation of tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) by human dendritic cells infected with an attenuated influenza A virus expressing a CTL epitope derived from the HER-2/neu proto-oncogene. *J Virol*, v. 77, n. 13, p. 7411-24, 2003.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Fields virology*. 5.ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

FODOR, E. et al. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol*, v. 73, n. 11, p. 9679-82, 1999.

GIRALDO, M. et al. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, v. 38, n. 4, p. 1453-60, 2000.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G. et al. Induction of protective immunity against malaria by priming-boosting immunization with recombinant cold-adapted influenza and modified vaccinia Ankara viruses expressing a CD8⁺-T-cell epitope derived from the circumsporozoite protein of *Plasmodium yoelii*. *J Virol*, v. 77, n. 21, p. 11859-66, 2003.

KIM, J. H. et al. HIV vaccines: lessons learned and the way forward. *Curr Opin HIV AIDS*, v. 5, n. 5, p. 428-34, 2010.

KIRALY, J.; KOSTOLANSKY, F. Reverse genetics and influenza virus research. *Acta Virol*, v. 53, n. 4, p. 217-24, 2009.

LEE, B. Y. et al. The potential economic value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) vaccine in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 4, n. 12, p. e916, 2010.

MACHADO, A. V. et al. Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter. *Virology*, v. 313, n. 1, p. 235-49, 2003.

MACHADO, A. V. et al. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther*, v. 17, n. 9, p. 898-908, 2006a.

MACHADO, A. et al. Recombinant influenza A viruses harboring optimized dicistronic NA segment with an extended native 5' terminal sequence: induction of heterospecific B and T cell responses in mice. *Virology*, v. 345, n. 1, p. 73-87, 2006b.

MASOPUST, D. Developing an HIV cytotoxic T-lymphocyte vaccine: issues of CD8 T-cell quantity, quality and location. *J Intern Med*, v. 265, n. 1, p. 125-37, 2009.

MIYAHIRA, Y. et al. Immune responses against a single CD8⁺-T-cell epitope induced by virus vector vaccination can successfully control *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*, v. 73, n. 11, p. 7356-65, 2005.

MULLER, U. et al. Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. *Eur J Immunol*, v. 33, n. 1, p. 70-8, 2003.

NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Reverse genetics systems for the generation of segmented negative-sense RNA viruses entirely from cloned cDNA. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 283, p. 43-60, 2004.

PAN, A. A.; McMAHON-PRATT, D. Amastigote and epimastigote stage-specific components of *Trypanosoma cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. Purification and molecular characterization of an 83-kilodalton amastigote protein. *J Immunol*, v. 143, n. 3, p. 1001-8, 1989.

PARADA, H. et al. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol*, v. 60, n. 1 p. 49-54, 1997.

RODRIGUES, M. M. et al. Immunodominance: a new hypothesis to explain parasite escape and host/parasite equilibrium leading to the chronic phase of Chagas' disease? *Braz J Med Biol Res*, 2008.

RODRIGUES, M. M. et al. Importance of CD8 T cell-mediated immune response during intracellular parasitic infections and its implications for the development of effective vaccines. *An Acad Bras Cienc*, v. 75, n. 4, p. 443-68, 2003.

SCHIRMBECK, R. et al. The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens. *Mol Ther*, v. 16, n. 9, p. 1609-16, 2008.

VARADARAJAN, N. et al. A high-throughput single-cell analysis of human CD8+ T cell functions reveals discordance for cytokine secretion and cytotoxicity. *J Clin Invest*, 2011.

VASCONCELOS, J. R. et al. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther*, v. 15, n. 9, p. 878-86, 2004.

WHO. Chagas disease: control and elimination. In: *WORLD HEALTH ASSEMBLY, 62*. Geneva, May 2009. Proceedings... Geneva: World Health Organization, 2009. p. 4.

Categoria Integração

1º Lugar

MAL DE CHAGAS, UNA ENFERMEDAD PRESENTE
PERO OLVIDADA. ESTUDIOS *IN-VITRO*//*IN-VIVO*
DE NUEVAS FORMULACIONES SÓLIDAS Y
LÍQUIDAS DE BENZNIDAZOL

Autores: Claudio Javier Salomon, 49 anos, argentino, com pós-doutorado
Darío Leonardi, 38 anos, argentino, com pós-doutorado
Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho, 31 anos, brasileiro, com pós-doutorado
María Celina Lamas, 44 anos, argentina, com pós-doutorado
Livia Cristina Lira de Sá Barreto, 33 anos, brasileira, com pós-doutorado

Países: Argentina e Brasil

Mal de Chagas, una enfermedad presente pero olvidada. Estudios *in-vitro/in-vivo* de nuevas formulaciones sólidas y líquidas de Benznidazol

Resumen

El mal de Chagas constituye una de las mayores causas de morbimortalidad entre los habitantes de Latinoamérica. Se estima que hay cerca de 90 millones de personas en riesgo de infección y más de 8 millones de infectados en los 18 países endémicos. Por otra parte, el número de nuevos casos anuales por transmisión vectorial fue de alrededor de 42 000 y de recién nacidos infectados por la enfermedad de Chagas congénita fue casi 15 000 al año. Uno de los dos fármacos empleados para combatir esta parasitosis es el benznidazol, eficaz en la fase aguda de la infección chagásica, aunque es controvertida su utilidad en la etapa crónica. A pesar del amplio empleo de este fármaco en gran parte de América Latina, aún no se han desarrollado formulaciones alternativas a los comprimidos convencionales. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de nuevas formulaciones sólidas y líquidas de benznidazol a través de la preparación de dispersiones sólidas, complejos de inclusión con ciclodextrinas, microcristales, micropartículas y el posterior desarrollo de formas farmacéuticas finales en comprimidos y cápsulas. Se llevaron a cabo las evaluaciones *in vitro/in vivo* de los diferentes sistemas preparados para caracterizar al BZL y analizar si las distintas alternativas tecnológicas presentadas podrían ser más eficaces que el medicamento convencional disponible. Los resultados *in vitro* demostraron que tanto la solubilidad como la velocidad de disolución de BZL desde los sistemas preparados fue mayor que en el BZL convencional. Los ensayos *in vivo* demostraron que tanto la biodisponibilidad como la actividad tripanocida del fármaco se incrementaron aplicando las estrategias tecnológicas mencionadas.

En conclusión, se ha demostrado en este trabajo que es posible incrementar la efectividad y eficacia de BZL, en animales, por medio de formulaciones alternativas.

1. Introducción

La enfermedad de Chagas es una zoonosis descubierta por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934), quien identificó por primera vez la infección causada por el *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi) en 1909 (CHAGAS, 1909). Su estudio incluye la descripción del ciclo de vida del parásito, y los vectores, animales y humanos que actúan como reservorios. En la actualidad, la enfermedad de Chagas sigue siendo un serio problema de salud pública y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en América Latina, con estimaciones de cerca de 90 millones de personas en riesgo de infección, y más de 8 millones de personas infectadas (PINTO-DIAS; SCHOFIELD, 2010; OPS, 2003; MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

La enfermedad de Chagas se transmite principalmente por insectos, conocidos como «vinchucas», a través de las membranas mucosas o por mordeduras. Por otra parte, la difusión de esta parasitosis puede ocurrir por la transfusión de sangre de personas infectadas con el T. cruzi o por trasplante de órganos. Las mujeres embarazadas infectadas también pueden transmitir T. cruzi a su recién nacido, lo que resulta en la enfermedad de Chagas congénita. La enfermedad se caracteriza por tres formas clínicas: aguda, indeterminada y crónica. La fase aguda suele ser una enfermedad leve, aunque puede presentar síntomas de fiebre, hepatoesplenomegalia, meningoencefalitis y miocarditis con una tasa de letalidad inferior al 5 %. La fase indeterminada, por lo general asintomática, comprende un período de 10 a 20 años y casi el 30 % de los pacientes infectados desarrollan la forma crónica de la enfermedad, dando lugar a diferentes patologías en el tracto gastrointestinal, trastornos cardíacos severos y del sistema nervioso central y periférico (SOSA ESTANI; SEGURA, 2006). En los últimos años, y debido a los movimientos migratorios, la enfermedad de Chagas se convirtió en una seria preocupación en diversas regiones no endémicas (GASCON; BERN; PINAZO, 2010). Cerca de 300 000 personas viven con enfermedad de Chagas en los EE. UU., y más de 80 000 casos se reportan en España (SCHMUNIS; YADON, 2010). En América del Norte, esta infección parasitaria presenta consecuencias para

la salud pública, principalmente debido a la propagación de la parasitosis por medio de transfusiones de sangre y de trasplantes de órganos provenientes de donantes infectados (LEIBY et al. 1999; BOWLING; WALTER, 2009).

Se debe mencionar que de los 1393 nuevos fármacos aprobados entre 1975 y 1999 en el mundo, solo 13 fueron para el tratamiento de las enfermedades olvidadas, pero ninguno de ellos se relacionó con la enfermedad de Chagas (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Como consecuencia, hasta la fecha, solo hay dos agentes terapéuticos aplicados al tratamiento la enfermedad de Chagas (figura 1).

Figura 1. Fármacos para la enfermedad del Mal de Chagas.



Uno de ellos es Nifurtimox (NFX), producido por Bayer Health Care como Lampit[®], disponible solo en comprimidos de 120 mg (SALOMON, 2011). El otro fármaco, el benznidazol (BZL), era producido por Roche como Rochagan[®] (Brasil) o Radanil[®] (Argentina), y actualmente le ha otorgado los derechos de producción a LAFEPE, un laboratorio del estado de Pernambuco (Brasil) y disponible en comprimidos de 100 mg (JANNIN, J.; VILLA, 2007). Ambos se utilizan en la fase aguda con tasas de curación de hasta 80 % después de 2 meses de tratamiento. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes es el gran número de efectos adversos que presentan estos fármacos (SALOMON, 2011).

Recientemente, y debido a la necesidad de contar con otras alternativas terapéuticas, se presentaron comprimidos con dosis menores de BZL. A partir de una alianza conformada por la Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (Drugs for Neglected Diseases initiative, DNDi) y el Laboratorio Farmacéutico de Pernambuco (LAFEPE), Brasil, se inició el diseño de comprimidos pediátricos de BZL. Luego de diversos estudios in vitro/in vivo lograron obtener tabletas dispersables que contenían 12,5 mg de dicho fármaco. Estas tabletas se adaptan a las necesidades de neonatos y niños pequeños, con un peso menor 20 kg, ya que presentan una fácil disolución

que facilita su administración. Claramente, esta innovación contribuyó a mejorar la seguridad y adherencia a la terapéutica prescrita. El nuevo medicamento ha sido aprobado y registrado por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) de Brasil bajo el número 1018301450062 (LAFEPE, s.d.).

Otra alternativa de producción de BZL en comprimidos se originó en el año 2010, cuando el Ministerio de Salud de Argentina redefinió los lineamientos existentes para la prevención y el tratamiento de la enfermedad de Chagas, impulsando un trabajo multisectorial con el fin de resolver esta necesidad. Esta alianza involucró a los Laboratorios ELEA y MAPRIMED junto con la Fundación Mundo Sano. Uno de los aspectos más novedosos de esta medicación producida en Argentina es que se formularon los comprimidos de 100 mg y una nueva presentación de BZL en comprimidos de 50 mg, dirigida, en particular, a pacientes pediátricos. En enero de 2012, ambas formas de dosificación fueron aprobadas con el nombre de Abarax[®] por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) de la Argentina, bajo la disposición 0520 (ARGENTINA, 2012).

Con base en lo descripto, el objetivo de este trabajo colaborativo fue el diseño y preparación de nuevas formas farmacéuticas sólidas y líquidas de BZL para poder facilitar y mejorar el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Nuestro equipo produjo una serie relevantes avances en el desarrollo de nuevas formulaciones farmacéuticas de BZL, tales como comprimidos de rápida disolución a partir de microcristales; complejos de inclusión con ciclodextrinas y su formulación en comprimidos efervescentes; sistemas microparticulados poliméricos, comprimidos y cápsulas a partir de dispersiones sólidas, y formulaciones líquidas conteniendo sistemas de cosolvencia. Las formulaciones fueron caracterizadas *in vitro* por medio de diversas metodologías y también *in vivo*, evaluando la biodisponibilidad y la actividad tripanocida en animales. Hasta la fecha, cada uno de los enfoques ha sido novedoso y original, lo que permite inferir la potencialidad de los resultados obtenidos.

2. Materiales

BZL fue suministrado por Roche® (Brasil). Polietilenglicoles (PEG), y ciclodextrinas (CD) fueron adquiridos en Aldrich (Argentina). PVP fue donada por ISP (Argentina). Ácido tartárico y bicarbonato de sodio fueron proporcionados por Natural Farma (Brasil). Hidroxipropilmetilcelulosa, Metocel F50, Premium LV (F50), K100 Premium LV (K100), E10m Premium LV (E10m) y almidón pregelatinizado fueron adquiridos en Colorcon. Hidroxietilcelulosa QP 300 fue comprada en Polytecno (San Pablo, Brasil). Saporiti (Argentina) suministró almidón de maíz, estearato de magnesio y lactosa.

3. Métodos

3.1. Metodología analítica

Las valoraciones de BZL a lo largo de este estudio se realizaron mediante espectroscopia UV-VIS a 324 nm (MAXIMIANO, 2010).

3.2. Mezclas físicas

Consistió en la mezcla de los componentes y su posterior tratamiento con mortero y pilón durante 5 minutos, hasta obtener un producto homogéneo (LEONARDI, 2007).

3.3. Dispersiones sólidas

Método de evaporación del solvente. Consistió en solubilizar el fármaco en etanol y el transportador en agua, posteriormente se mezclaron ambas soluciones y el solvente fue evaporado a presión reducida (LEONARDI, 2007).

3.4. Método de malaxado

Consistió en mezclar los componentes con mortero y pilón durante 5 minutos. Luego se agregó una cantidad de agua para la formación de una masa húmeda, hasta obtener un producto homogéneo (MAXIMIANO et al., 2011b).

3.5. Velocidad de disolución

Los ensayos de disolución de BZL se realizaron en las distintas formulaciones conteniendo 100 mg de principio activo en medio de disolución HCl 0,1 N (900 mL) a 37 °C según lo descrito por nuestros grupos de investigación (LEONARDI, 2007; MAXIMIANO et al., 2011b; LEONARDI et al., 2009).

3.6. Coeficiente de reparto

El coeficiente de reparto de BZL fue determinado utilizando n-octanol como fase orgánica y agua bajo agitación a temperatura ambiente (MAXIMIANO et al., 2010).

3.7. Difracción de rayos X

Los estudios de rayos X fueron realizados en difractor de rayos X en un intervalo de 2 a 60° 2 θ (MAXIMIANO et al., 2011b; LEONARDI et al., 2009).

3.8. Calorimetría diferencial de barrido

Se analizaron muestras de aproximadamente 3 mg en cápsulas de aluminio en atmósfera de nitrógeno aplicando diferentes velocidades de calefacción (MAXIMIANO et al., 2010).

3.9. Microscopia

La evaluación morfológica de las formulaciones desarrolladas se llevó a cabo por microscopía electrónica de barrido y por microscopía óptica (MAXIMIANO et al., 2011b; LEONARDI et al., 2009).

3.10. Propiedades de flujo

Los ensayos reológicos fueron evaluados a partir de los parámetros propuestos por Carr, como compresibilidad, velocidad de flujo y ángulo de reposo según lo descrito previamente (LEONARDI, 2007; MAXIMIANO et al., 2011b).

3.11. Superficie específica

El área superficial específica de las muestras fue estimada mediante la técnica de adsorción de nitrógeno aplicando el modelo BET (MAXIMIANO et al., 2010).

3.12. Caracterización fisicoquímica de los comprimidos

Las determinaciones detalladas en farmacopea para la evaluación de los comprimidos, como peso medio, resistencia a la rotura, friabilidad, desintegración y disolución se realizaron de acuerdo con la bibliografía (LEONARDI, 2007; MAXIMIANO et al., 2011b).

3.13. Optimización mediante diseño experimental

El logro de cierta calidad predecible con las especificaciones deseadas y predeterminadas se denomina con el término de «calidad mediante el diseño» (CMD). Para las optimizaciones correspondientes al presente informe se utilizó el programa Expert-Design versión 6.0.10 (LEONARDI et al., 2009).

3.14. Animales

Los animales fueron mantenidos en las condiciones de luz, temperatura y alimentación de acuerdo con las normas internacionales para el cuidado de animales de laboratorio, de acuerdo con las normas de bioética de cada institución participante en este trabajo (MAXIMIANO et al., 2011a; MANARIN, 2012).

3.15. Parásitos

Se utilizaron formas tripomastigote de la cepa Y y cepa Tulahuén de *T. cruzi*, mantenida en ratones CBI de 21 días de edad por pasajes intraperitoneales (i.p.) cada 7 días (MAXIMIANO et al., 2011a; MANARIN, 2012).

3.16. Infección con *T. cruzi*

Los ratones fueron infectados por vía intraperitoneal con 150 tripomastigotes. Para obtener los tripomastigotes, la sangre de ratón fue extraída por punción cardíaca con jeringa heparinizada. La sangre obtenida se diluyó con solución

fisiológica y centrifugó a 500 g durante 10 minutos. Se obtuvo, la fracción acuosa (plasma + solución fisiológica) que se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos. Se realizó el recuento de parásitos vivos del pellet en cámara de Neubauer (MANARIN, 2012).

3.17. Tratamiento con BZL

La administración del BZL a los ratones se realizó vía oral con una sonda intragástrica 1 vez por día, luego de los 7 días y 14 días posinfección (MANARIN, 2012).

En el caso de las formulaciones líquidas, se evaluó una solución de BZL en PEG/HCl (70%-30%) y una suspensión de BZL en carboximetilcelulosa (1%). Se les administró a los ratones 3 dosis de 20, 40 y 60 mg/kg de peso.

En el caso de las tabletas, se les administró a los ratones 3 dosis de 25, 50 y 100 mg/kg de peso. Las tabletas se suspendieron en goma arábiga (4%) (MAXIMIANO et al., 2011a).

3.18. Parasitemias

Las parasitemias se realizaron a los 7, 14 y 21 días posinfección. Se sacó sangre de la cola de los ratones y se contaron los parásitos contenidos en 50 campos microscópicos de 400× (MAXIMIANO et al., 2011a; MANARIN, 2012).

3.19. Medición de anticuerpos anti-*T. cruzi*

Se trabajó con suero obtenido a partir de sangre extraída por punción cardíaca de los animales estudiados. El suero se separó por centrifugación y luego fue congelado a -20°C hasta su procesamiento. Las muestras de sueros fueron extraídas a los 21 días posinfección. Los anticuerpos específicos se determinaron mediante la técnica de enzimo-inmunoanálisis. Se utilizaron placas de poliestireno recubiertas con antígenos recombinantes de *T. cruzi*. Los sueros se diluyeron 1/3 y se incubaron 2 horas a 37°C . Luego de 5 lavados con el buffer de lavado provisto por el comerciante, se agregó IgG de conejo a-IgG de ratón conjugado con peroxidada a una dilución 1/1000 y se incubó 2 h a 37°C . Se lavó nuevamente y se agregó una solución con el sustrato de la enzima (peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina). Luego de 10 minutos, se frenó la reacción con H_2SO_4 y se midió la densidad óptica a 450 nm (MANARIN, 2012).

3.20. Dosificación de BZL en suero de ratones

Los animales recibieron una única dosis vía oral correspondiente a 25 mg/kg peso de BZL (0,625 mg) por ratón y luego de 10 minutos, 20 minutos, 1 h, 3h y 5 h, se extrajeron 50 µl de sangre de cada ratón. La sangre se procesó para extraer el BZL con 100 µl de acetonitrilo-dimetilsulfóxido (1:1, v/v) a una relación 2:1 (solvente de extracción: sangre), se incubó a 4 °C por 30 min y se centrifugó a 6000 g por 20 min. Luego, el proceso se completa con una precipitación del SN con 25 µl de ácido tricloro acético al 10 % a -12 °C durante 15 min. Finalmente, se centrifugó a 10000 g por 10 min y los SN resultantes se ensayaron cromatográficamente (fase móvil isocrática acetonitrilo-agua (40:60, v/v), a una velocidad de flujo de 0,9 mL/min. Se construyó una curva estándar de BZL, la misma fue procesada de igual manera que las muestras biológicas (MANARIN, 2012).

3.21. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los ensayos se realizó el análisis de la variancia de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis y la prueba «U» de Mann-Whitney. Para analizar las diferencias entre los distintos grupos utilizamos ANOVA seguido de Tukey para las comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue < 0,05 (MAXIMIANO et al., 2011a; MANARIN, 2012).

4. Resultados y discusión

4.1. Evaluación biofarmacéutica de BZL

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) es una herramienta muy útil para decidir cuáles son las alternativas tecnológicas que van a mejorar las condiciones de disolución-absorción de una forma farmacéutica sólida (KASIM, et al., 2012). De acuerdo con la lista de Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de la Salud, el BZL es un fármaco perteneciente a la clase I, lo que indica una alta permeabilidad intestinal y alta solubilidad en agua (LINDENBERG; KOPP; DRESSMAN, 2004). Recientemente, se lo ha reclasificado como de clase III dentro del mismo sistema, así como según los criterios de la FDA, lo que implica baja permeabilidad y alta solubilidad en agua (KHANDELWAL et al., 2007).

Debido a la falta de más datos que permitan esclarecer más las propiedades biofarmacéuticas de BZL, realizamos un detallado estudio que demostró que el logP del BZL era de 0,7 y, de acuerdo con referencias previas, todo fármaco con un valor de logP menor a 1,7 se debería clasificar como poco permeable. En este mismo estudio hallamos que la velocidad intrínseca de disolución para el BZL era de apenas 0,182 mg/cm²/min, cuando lo recomendable es un valor por encima de 1 mg/cm²/min para que sea fácilmente soluble (MAXIMIANO et al., 2010).

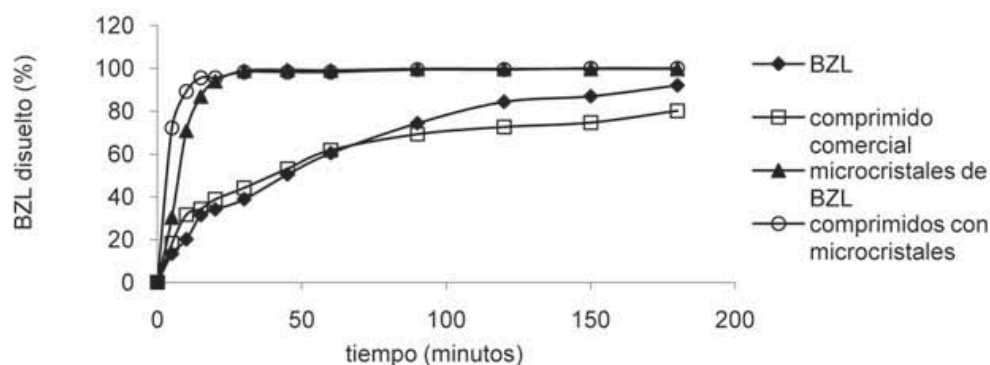
4.2. Microcristales comprimidos de BZL

La reducción del tamaño de las partículas es una estrategia para aumentar la superficie del fármaco, lo cual resulta eficaz para aumentar la velocidad y la absorción de un fármaco en el cual estos parámetros están limitados por su lenta disolución (LIVERSIDGE; CUNDY, 1992). La micronización mecánica es uno de los métodos más utilizados para obtener partículas de tamaño reducido. Sin embargo, hay varias desventajas asociadas a ella, como la aglomeración de partículas, la inestabilidad física o química de los cristales obtenidos y las características impropias de flujo de los polvos micronizados (DIAZ; MASTROMARCO; MASTROMARCO, 2001). Por lo tanto, en nuestro laboratorio se aplicó recientemente una técnica de micronización in situ, sin procesos mecánicos, por medio del agregado de un disolvente y la posterior precipitación añadiendo estabilizadores poliméricos para evitar aglomerados (RASENACK; MÜLLER, 2002; CUNHA-FILHO; MARTÍNEZ-PACHECO; LANDÍN, 2008). Logramos obtener microcristales de BZL por precipitación por cambio disolvente y su compresión en tabletas como una forma de dosificación sólida alternativa. Esta formulación libera el fármaco a una concentración óptima que produciría un efecto terapéutico mejor que la presentación comercial disponible de BZL. La formación de cristales de tamaño reducido se llevó a cabo por medio de una solución saturada de BZL preparada con disolventes orgánicos y agua. Además, varios excipientes poliméricos, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxietilcelulosa (HEC), almidón pregelatinizado (AP) y polietilenglicol (PEG) 400 fueron utilizados como agentes estabilizantes para recubrir los microcristales e inhibir el crecimiento cristalino. Se encontró que el solvente acetona-agua era la mezcla más eficaz para la precipitación de microcristales (MAXIMIANO et al., 2011a). Además, la tasa de disolución del fármaco

aumentó en presencia de los polímeros estabilizadores en comparación con BZL solo. Particularmente, HEC y PEG 400 fueron capaces de aumentar la disolución del fármaco hasta el 90 % en 10 minutos. Las micropartículas de BZL obtenidas en este estudio fueron cristales aciculares homogéneos de forma similar a los cristales originales, pero que difieren significativamente en términos granulométricos. De acuerdo con el análisis térmico, se observó que los microcristales de BZL y partículas no tratadas muestran características similares, sin cambios en el pico de fusión del fármaco. Los estudios de cristalografía de rayos X corroboran los estudios térmicos indicando que los patrones de difracción de los microcristales de BZL fueron similares a los del fármaco puro, lo que mostraría que la cristalinidad después de la precipitación no cambia esencialmente.

Posteriormente se desarrollaron formas farmacéuticas finales en comprimidos elaborados por compresión previa granulación seca, que contenían los microcristales de BZL. El proceso de compresión no alteró el rápido perfil de disolución de las micropartículas de BZL, es más, la solubilización del fármaco alcanzó el 85 % liberado en apenas minutos, en comparación con el 30 % obtenido para el medicamento comercial disponible a base de BZL (figura 2) (MAXIMIANO et al., 2011a). Los ensayos in vitro demostraron que la velocidad de disolución de los comprimidos y de los microcristales sin comprimir fue muy similar.

Figura 2. Perfil de disolución de microcristales de BZL



Este resultado es de sumo interés ya que el proceso de compresión no modificó el proceso de disolución del fármaco. Por otro lado, se puede observar claramente que la técnica propuesta de precipitación controlada fue efectiva para el aumento de la disolución de BZL, en comparación con el fármaco original y, sobre todo, en comparación con el medicamento

disponible y actualmente en uso (Radanil®). Con respecto a la evaluación in vivo frente a *T. cruzi*, cada grupo tratado con una dosis de 100 y 50 mg/kg tuvo una disminución significativa en el pico de la parasitemia en comparación con el grupo control, siendo más pronunciado en el caso de las formulaciones micronizadas (MAXIMIANO et al., 2011a). Así, los estudios in vivo confirmaron la utilidad de los microcristales de BZL como una alternativa novedosa y eficaz para mejorar el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

4.3. Complejos de inclusión de BZL

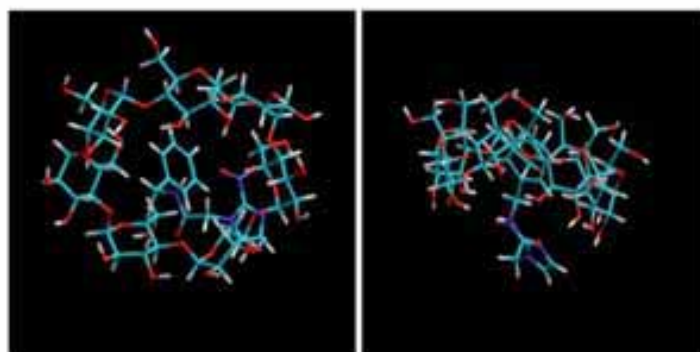
Otra estrategia tecnológica recientemente aplicada en nuestros laboratorios para mejorar las características biofarmacéuticas del BZL fue la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas (CD). En este caso, nuestros colegas de la Universidad de Pernambuco (Brasil) presentaron resultados similares (SOARES SOBRINHO et al., 2011). Las CD se obtienen durante la degradación enzimática del almidón y consisten en una serie de oligosacáridos cíclicos formados por 6 (α), 7 (β) u 8 (γ) unidades de α -D-[1,4] glucosa, que dan lugar a una estructura molecular toroidal, rígida y con una cavidad interior de volumen específico (LOFTSSON; BREWSTER, 2011). A pesar de su alta solubilidad en agua, la cavidad interna de las CD es apolar, por lo que estos compuestos son capaces de producir complejos de inclusión aceptando a moléculas hidrófobas en su interior y dando como resultado complejos de inclusión no covalentes. Dichos complejos tienen la capacidad de modificar significativamente las características fisicoquímicas de los fármacos, con impactos en su solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad. Entre las CD disponibles en el mercado, la β -CD y sus derivados poseen el tamaño de cavidad más apropiado para la formación de complejos de inclusión con el BZL, tal como hemos podido comprobar en nuestro equipo.

Una herramienta valiosa para intentar una aproximación teórica de la manera en la cual se dispone el fármaco dentro de la ciclodextrina es el modelado molecular. Es una técnica general que engloba métodos teóricos y técnicas computacionales para modelar o imitar el comportamiento de moléculas. El beneficio de esta técnica es que reduce la complejidad del sistema, permitiendo que muchas más partículas (átomos) sean considerados durante las simulaciones.

En nuestro caso, el estudio se llevó a cabo con el objeto de continuar con el análisis de las interacciones existentes entre la β -CD y BZL en el sistema 1:1

(equimolar). De acuerdo con lo observado en la figura 3 existiría una interacción entre el anillo aromático del BZL con los hidroxilos secundarios de la β -CD, ya que la disposición del anillo aromático sería en el centro de la cavidad de la misma. A su vez, se observa el anillo imidazólico del fármaco orientado hacia afuera de la cavidad de la CD. Sin embargo, se manifiesta que la molécula de BZL se curva para permitir una interacción entre la CD y el anillo imidazólico del fármaco. En esta disposición se posibilitaría una interacción con los hidroxilos primarios del C-6 de la CD. En concordancia con los estudios de RMN analizados anteriormente, la interacción se realizaría a través de los dos anillos presentes en la molécula del BZL con los -OH de la ciclodextrina (LEONARDI, 2007; MAXIMIANO et al. 2011; SÁ BARRETO et al., 2012).

Figura 3. Modelado molecular del sistema BZL: β -CD (1:1). Estructura tridimensional de la disposición del fármaco en relación con la CD



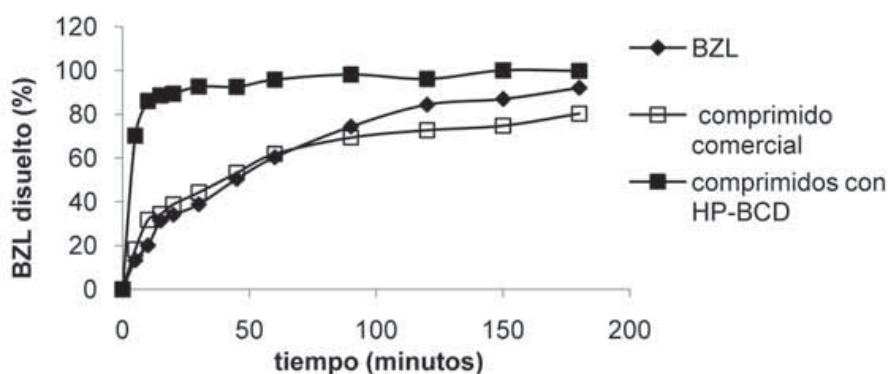
4.4. Comprimidos efervescentes de BZL

De acuerdo con el ensayo de equilibrio de solubilidad con distintas CD, la β -CD fue seleccionada para la formulación de comprimidos efervescentes con el propósito de obtener una forma farmacéutica que pudiera ser utilizada en pediatría. Elaboramos complejos de inclusión por el método malaxado y estos fueron comprimidos en matrices efervescentes. Los comprimidos efervescentes elaborados presentaron una notable mejora en la velocidad de disolución del BZL, con más de 80 % de la dosis disuelta en apenas 15 minutos, mientras que la formulación comercial de BZL (Rochagan[®]) disolvió solamente 30 % de la dosis. Según este estudio, la efervescencia promovió un efecto sinérgico en las características de disolución del fármaco (MAXIMIANO et al., 2011b).

En esta misma línea, realizamos estudios para evaluar la influencia que algunos polímeros podrían ejercer sobre la liberación del BZL desde los complejos de inclusión formulados. Vimos que la presencia de HMPC es capaz de modificar las características de liberación del fármaco, retrasando su liberación. Eso se debería a las interacciones electrostáticas del polímero con la superficie de las CD, formando agregados sólidos más difíciles de disolver. Notamos que este efecto estaba relacionado con la concentración del polímero (SÁ BARRETO et al., 2012).

Estos sistemas presentan una prometedora perspectiva para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, visto que pueden producir sistemas de liberación de no convencional que tendrían un impacto favorable en la absorción del fármaco (figura 4)

Figura 4. Perfil de disolución de comprimidos efervescentes de BZL



4.5. Micropartículas de BZL

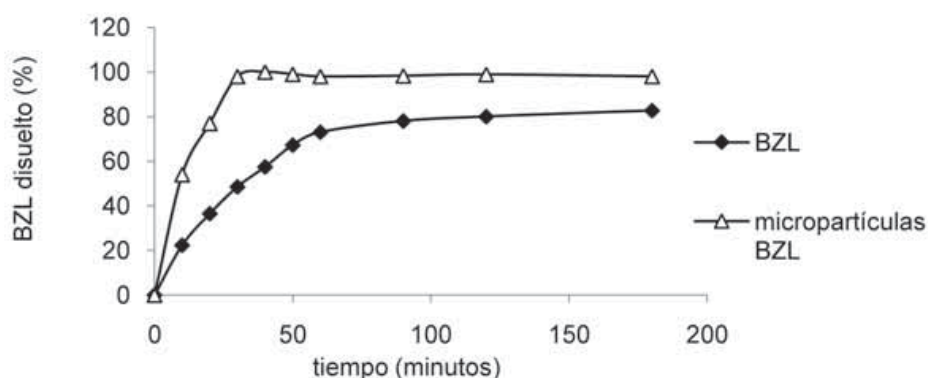
Los sistemas microparticulados pueden ser empleados como una herramienta muy útil para aumentar la solubilidad y velocidad de disolución de fármacos poco solubles. Poseen la capacidad de modificar ciertos parámetros farmacocinéticos y la biodistribución de las moléculas transportadas, tal como lo hemos probado en nuestro grupo (LEONARDI et al., 2010). En general, los sistemas microparticulados farmacéuticos se formulan a partir del empleo de polímeros naturales y sintéticos, entre los que se destacan el alginato, el dextrano, la goma arábiga (goma acacia) y el quitosano.

El quitosano, una poliamina lineal formada por unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina, es un polímero natural obtenido por desacetilación de quitina, ampliamente utilizado como soporte para el desarrollo de diferentes formulaciones farmacéuticas (LEONARDI; LAMAS; OLIVIERI, 2008; SINHA et al., 2004).

El procedimiento de microencapsulación que elegimos para la preparación de micropartículas de BZL fue la coacervación-separación de fases. La coacervación es una etapa intermedia entre disolución y precipitación, es decir, hay una desolvatación parcial en contraposición a la desolvatación exhaustiva asociada al proceso de precipitación (LEONARDI; LAMAS; OLIVIERI, 2008). Si bien el quitosano ha sido muy utilizado como excipiente farmacéutico en la preparación de sistemas particulados, hasta la fecha, la única aplicación del quitosano para el transporte de compuestos antichagásicos fue propuesta por nuestro grupo. Se emplearon diseños experimentales para optimizar el proceso de producción y se analizó la influencia de varios factores en la formulación de las micropartículas. El análisis estuvo compuesto de las siguientes tres fases: (I) la detección de los factores influyentes con un diseño Plackett-Burman; (II) el análisis de las respuestas usando redes neuronales artificiales, la selección de las condiciones óptimas de trabajo, y (III) la verificación de la formulación óptima. La combinación óptima de quitosano fue 1,5 % (w/v) y de NaOH fue 6,0 % (w/v), a una óptima velocidad de agitación fue de 1400 rpm (LEONARDI; LAMAS; OLIVIERI, 2008).

Los resultados obtenidos demostraron que las micropartículas presentaron una velocidad de disolución mayor para el BZL encapsulado en los sistemas particulados en comparación con el fármaco libre, confirmando que el procedimiento de trabajo aumentó la disolución del fármaco (figura 5).

Figura 5. Perfil de disolución de micropartículas de BZL



Las micropartículas fueron administradas por vía oral a ratas Wistar macho, de 100 días de edad, de 300 g de peso, cada animal recibió una dosis de 7,5 mg en 1 mL de agua destilada. La biodisponibilidad de las micropartículas obtenidas a partir del proceso de optimización se incrementó en 10 veces comparándolas con el fármaco puro (tabla 1).

Tabla 1. Concentración plasmática de BZL luego de la administración oral de las micropartículas y BZL en agua

	$AUC_{0-\infty}$ μg min/mL	$C_{m\acute{a}x.}$ (μg/mL)	$T_{m\acute{a}x.}$ (min)
BZL-H ₂ O	37 ± 7	0,15 ± 0,06	240
Micropartículas	376 ± 13 ^a	1,05 ± 0,01 ^b	120

^a diferente de BZL en H₂O (P < 0,05)

^b diferente de BZL en H₂O (P < 0,001)

Parte de estos resultados originales nos permitió la presentación de una solicitud de Patente en Argentina, bajo el expediente P 090101989 (SALOMON et al., 2009).

4.6. Dispersiones sólidas de BZL

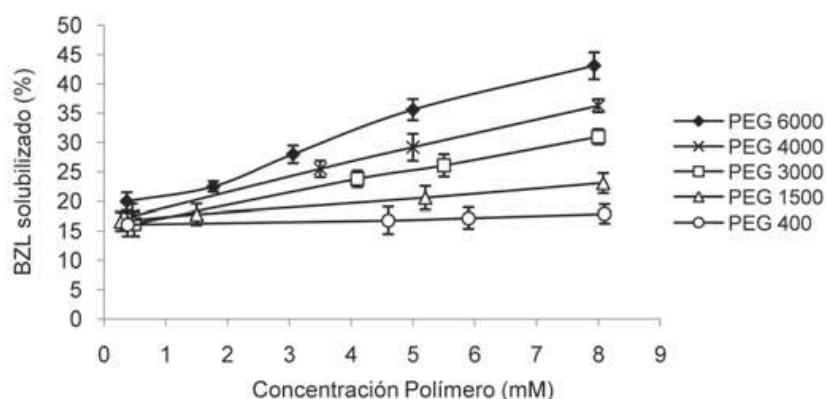
El término «dispersión sólida» se emplea para describir un grupo de sistemas en donde un fármaco está dispersado en una matriz inerte desde el punto de vista biológico. Esta técnica es muy útil para aumentar la velocidad de disolución y la biodisponibilidad de sustancias poco hidrosolubles (CHIOU; RIEGELMAN, 1971). Uno de los polímeros más utilizados como transportadores para la preparación de dispersiones sólidas son los polietilenglicoles (PEG) de distintos pesos moleculares.

En nuestro laboratorio preparamos dispersiones sólidas usando PEG con el objetivo de aumentar la solubilidad y velocidad de disolución de BZL y otros fármacos antiparasitarios (LEONARDI, 2007; LEONARDI et al., 2009). Esa misma estrategia fue empleada, contemporáneamente, por un grupo de colegas de la Universidad Federal de Pernambuco (Brasil) con resultados muy interesantes (LIMA et al., 2011).

En nuestro caso, evaluamos si la longitud del polímero (peso molecular) podía tener influencia en la solubilidad acuosa del fármaco y a tal fin se ensayaron los PEG de peso molecular 400, 1500, 3000, 4000 y 6000.

Pudimos mostrar que existían diferencias significativas en la concentración de BZL disuelto a medida que aumentaba el peso molecular del polímero, siendo el más eficaz el PEG 6000. Esto se debería a que al aumentar la cadena polimérica, disminuye la tensión superficial entre el fármaco y el medio solubilizante y al mismo tiempo aumenta la humectabilidad del fármaco (figura 6).

Figura 6. Estudio de solubilidad de BZL en presencia de distintos PEG



4.7. Comprimidos de BZL-PEG 6000

A partir de los resultados obtenidos seleccionamos al PEG 6000 como transportador para la elaboración de comprimidos y cápsulas de gelatina dura conteniendo BZL. De acuerdo con los datos de la literatura, no se ha descrito la preparación de este tipo de formulaciones con dispersiones sólidas hasta la fecha. En nuestro equipo, se formularon los comprimidos de BZL a partir de las dispersiones sólidas de BZL-PEG 6000 en proporciones 1:1 (peso en peso) por el método de granulación húmeda (LEONARDI, 2007). El objetivo del diseño de los comprimidos de BZL era aumentar la concentración de fármaco disuelto en el tiempo, en comparación con el medicamento disponible. En ese sentido se tomó como parámetro la cantidad de fármaco disuelto en 30 minutos (Q_{30}), de manera similar a otras formulaciones que se consideran de «liberación inmediata».

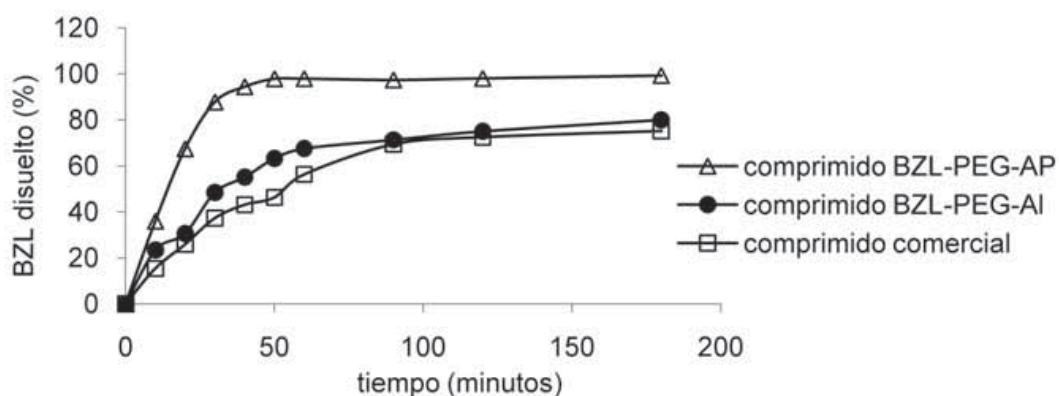
Preparamos dos formulaciones que contenían el sistema BZL:PEG 6000 (1:1 p/p). A una de ellas se le agregó almidón de maíz (Al) en un 10% y a la restante AP en la misma proporción (LEONARDI, 2007). El detalle de los excipientes y sus cantidades se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Comprimidos de BZL:PEG 6000 en proporción 1:1 p/p

Composición	Cantidad (mg)	Cantidad (mg)	Porcentaje (%)
	BZL-PEG-Al	BZL-PEG-AP	
Benznidazol	100	100	33,33
PEG 6000	100	100	33,33
Almidón	30		6,70
AP		33	6,70
Lactosa	64,50	62	24,80
PVP	0,6 mL	6 mL	0,20
Estearato de Mg	5	6	1,70

De acuerdo con la figura 7, la presencia de AP (BZL-PEG-AP) en la formulación fue fundamental para modificar e incrementar la liberación de BZL, en comparación con el comprimido que contenía almidón convencional (BZL-PEG-Al) y con el comprimido comercial (Radanil®). Se obtuvo un Q_{30} de 88 %, que demostró la versatilidad y utilidad de la dispersión sólida en conjunto con el AP para obtener una nueva formulación de BZL de rápida disolución.

Figura 7. Perfil de disolución de comprimidos de BZL-PEG 6000 con AP



4.8. Cápsulas de gelatina dura de BZL-PEG 6000

Otro de los objetivos de nuestro trabajo fue desarrollar, por primera vez hasta la fecha, cápsulas de gelatina dura de BZL, como una alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

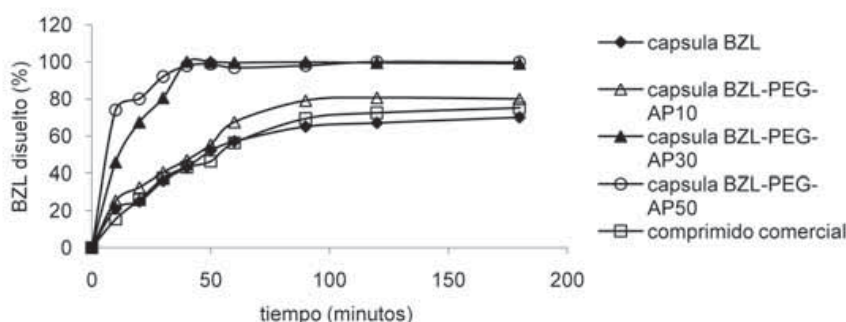
A partir de las dispersiones de BZL:PEG 6000 en proporción 1:1 p/p, se prepararon cápsulas con y sin AP, que se detallan en la tabla 3. La cantidad de AP utilizada fue de 10 %, 30 % y 50 %.

Tabla 3. Composición (mg) de cápsulas de BZL:PEG 6000 (1:1) con 10%, 30% y 50% de AP

Composición	BZL-PEG	BZL-PEG- AP ₁₀	BZL-PEG- AP ₃₀	BZL-PEG- AP ₅₀
Benznidazol	100	100	100	100
PEG 6000	100	100	100	100
Lactosa	695	605	425	245
AP	--	90	270	450
Est. magnesio	5	5	5	5

Se postulaba lograr obtener un Q_{30} mayor o igual al 80 %, de manera similar a los comprimidos previamente formulados. Como se ve en la figura 8, las cápsulas que contenían un 30 % y un 50 % de AP mejoraron notablemente los perfiles de disolución del fármaco y al mismo tiempo presentaron valores de Q_{30} mayores al 80 %. El mayor valor de Q_{30} se logró a partir de BZL-PEG-AP₅₀, (90 %), mientras que la formulación sin AP liberó solamente un 36 % (LEONARDI, 2007).

Figura 8. Perfil de disolución de cápsulas de BZL con AP



4.9. Formas farmacéuticas líquidas de BZL

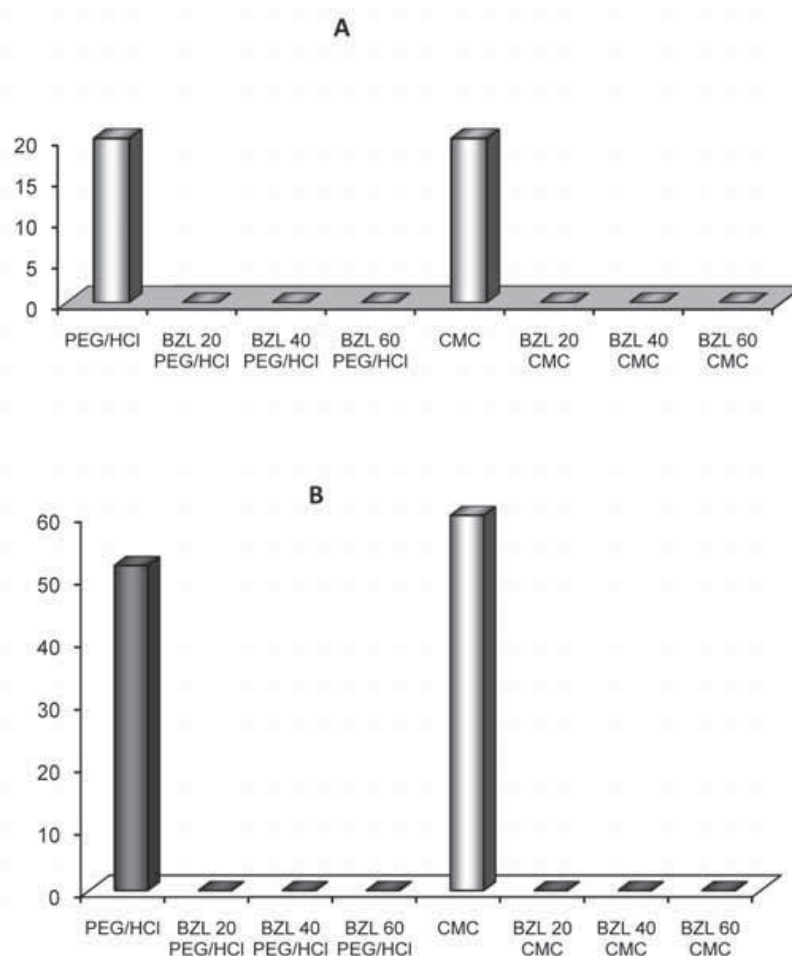
Es importante señalar que los comprimidos de NFX y de BZL se utilizan frecuentemente en bebés y niños. Sin embargo, este tipo de forma farmacéutica es totalmente inadecuada para los niños menores de 4 años (MICHELE et al. 2002). Debido a la ausencia de formulaciones líquidas comerciales, la opción puede ser las preparadas en el momento (extemporáneas) (SALOMON, 2012). Desafortunadamente, la producción de formulaciones extemporáneas para la enfermedad de Chagas en las regiones endémicas carece de los recursos necesarios. La ausencia de formulaciones líquidas de BZL, tanto para uso en pacientes adultos como en pacientes pediátricos, se debe principalmente a su baja solubilidad en agua (mg/mL), lo que conlleva a una muy baja concentración del principio activo en soluciones bebibles, tales como gotas y jarabes. Una de las alternativas para la formulación de formas farmacéuticas líquidas es el empleo de cosolventes.

En este trabajo los cosolventes que elegimos fueron alcoholes de cadena corta: etanol, propilenglicol, alcohol bencílico, glicerol y derivados de PEG de bajo peso molecular (200 a 600). Esta estrategia permitió aumentar la solubilidad de BZL hasta valores sustancialmente mayores que la solubilidad de BZL en agua (0,4 mg/mL) (LAMAS, 2006).

Los sistemas de formados por alcohol etílico y PEG 400 en soluciones acuosas fueron los más eficaces, debido al incremento de la solubilidad de BZL en un rango de entre 8 y 10 mg/mL. Las formulaciones líquidas no presentaron incompatibilidades con el envase, ni problemas de precipitación o degradación luego de 18 meses envasadas. También se estudió la actividad del BZL en solución sobre epimastigotes de *T. cruzi* en cultivo, obteniéndose valores de IC_{50} (concentración inhibitoria máxima) similares a los obtenidos al utilizar BZL disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (LAMAS, 2006).

La originalidad e innovación del empleo de cosolventes para la formulación líquida de BZL se tradujo en una solicitud de patente que presentamos en Argentina según el expediente P 060104961 (SALOMON, C. J.; LAMAS, M. C.; SERRA, 2006). Posteriormente se llevaron a cabo ensayos en ratones infectados con *T. cruzi*. Los resultados indicaron que en los animales infectados la parasitemia aumenta a medida que progresa la infección, registrándose mortalidad el último día estudiado. Las diferencias son significativas al día 14 y 21 posinfección con respecto a los animales infectados y luego tratados con BZL (figura 9). Entre los animales infectados y tratados con BZL se observa una disminución de la parasitemia significativa con respecto a los animales no tratados, independientemente de la dosis de BZL utilizada y el vehículo empleado, PEG/HCl o CMC (MANARIN, 2012). Sin embargo, la preparación y dosificación de soluciones es mucho más conveniente que la de suspensiones.

Figura 9. Estudio de parasitemia en ratones infectados a los 14 (A) y 21 (B) días posinfección



Determinamos el nivel de anticuerpos específicos contra el parásito y observamos que los animales que no recibieron BZL exhibieron altos niveles de anticuerpos, a diferencia de los animales tratados con las formulaciones líquidas que mostraron bajos niveles de anticuerpos. Luego, evaluamos si la farmacocinética del fármaco se vería afectada por el hecho de que el BZL se encontrara en suspensión o en solución. En el caso del BZL en solución se alcanzó un máximo de concentraciones plasmáticas a las 3-4 h tras la administración, mientras que cuando el BZL se encuentra en suspensión las concentraciones plasmáticas máximas de BZL se alcanzan entre la 1-3 h tras la administración, lo que demostró ciertas similitudes en la absorción del fármaco, independientemente de su forma de administración (MANARIN, 2012).

5. Conclusiones

Gracias a diversas actividades internacionales, la transmisión de *T. cruzi* ha sido efectivamente disminuida en muchas regiones de América Latina. Hasta la fecha, el BZL siguen siendo el fármaco de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en varias regiones de América Latina. Por lo tanto, este trabajo colaborativo ha cumplido el objetivo propuesto de avanzar en el desarrollo de nuevas formulaciones sólidas y líquidas a partir de la aplicación de técnicas conocidas e innovadoras, particularmente para el BZL.

Los estudios fisicoquímicos *in vitro* y los ensayos en animales infectados demostraron que las distintas estrategias diseñadas por este equipo de investigación fueron las adecuadas para aumentar la eficacia del BZL. Se debe mencionar que, en su gran mayoría, las alternativas descritas en este trabajo son originales e innovadoras y por lo tanto se puede avizorar una potencial transferencia al sector público y privado. A partir de estos resultados, tal vez se pueda lograr finalmente contar con tratamientos terapéuticos en los cuales se pueda determinar la dosis óptima, la duración del tratamiento, y los esquemas de dosificación de los medicamentos existentes, con el fin de mejorar el tratamiento de esta enfermedad olvidada.

6. Referencias bibliográficas

ARGENTINA. Ministerio de Salud. Disposición n° 0520. Buenos Aires, 26 ene. 2012. Disponible en: <www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/enero_2012/Dispo_0520-12.pdf>.

BOWLING, J.; WALTER, E. A. Recognizing and meeting the challenge of Chagas disease in the USA. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, n. 7, p. 1223-1234, 2009.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, n. 1, p. 159-218, 1909.

CHIOU, W. L.; RIEGELMAN, S. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. *J. Pharm. Sci.*, n. 60, p. 1281-1302, 1971.

CUNHA-FILHO, M. S.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Dissolution rate enhancement of the novel antitumoral beta-lapachone by solvent change precipitation of microparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, n. 69, p. 871-877, 2008.

DIAZ, I.; MASTROMARCO, A.; MASTROMARCO, L. Micronización: su aplicación tecnológica en la elaboración de formas farmacéuticas terminadas. *Rev. Cubana Farm.*, n. 35, p. 159-164, 2001.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas' disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* n. 115, p. 22-27, 2010.

JANNIN, J.; VILLA, L. An overview of Chagas' disease treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, n. 102, p. 95-97, 2007.

KHANDELWAL, A. et al. Computational Models to Assign Biopharmaceutics Drug Disposition Classification from Molecular Structure. *Pharm. Res.* n. 24, p. 2249-2262, 2007.

KASIM, N. A. et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol. Pharm.*, n. 12, p. 85-96, 2012.

LAFEPE. Benznidazol. Disponible en: <<http://www.lafepe.pe.gov.br/LAFEPE/noticias/noticiario/Benznidazol-Guiadecompras-Ing.pdf>>.

LAMAS, M. Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *Int. J. Pharm.*, n. 307, p. 239-243, 2006.

- LEIBY, D. A. et al. Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *N. Engl. J. Med.*, n. 341, p. 1237-1239, 1999.
- LEONARDI, D. Modificaciones sintéticas de macromoléculas para su aplicación en el transporte específico de droga. 2007. Tesis (Doctoral) – Facultad de Cs. Bioq. y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
- LEONARDI, D.; LAMAS, M. C.; OLIVIERI, A. C. Multiresponse optimization of the properties of albendazole-chitosan microparticles. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, n. 48, p. 802-807, 2008.
- LEONARDI, D. et al. Development of novel formulations for Chagas' disease. Optimization of benzimidazole chitosan microparticles based on artificial neural networks. *Int. J. Pharm.* n. 367, p. 140-147, 2009.
- LEONARDI, D. et al. High efficacy of albendazole-PEG 6000 in the treatment of *Toxocara canis* larva migrans infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, n. 64, p. 375-378, 2009.
- LEONARDI, D. et al. In vitro-in vivo studies of albendazole microparticles for the treatment of *Toxocara canis* larva migrans infection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, n. 75, p. 451-454, 2010.
- LIMA, A. A. et al. The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benzimidazole solubility. *J. Pharm. Sci.*, n. 100, p. 2243-2251, 2011.
- LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, n. 58, p. 265-278, 2004.
- LIVERSIDGE, G.; CUNDY, K. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int. J. Pharm.*, n. 125, p. 91-97, 1995.
- LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *J. Pharm. Pharmacol.*, n. 63, p. 1119-1135, 2011.
- MANARIN, R. Efficacy of novel benzimidazole solutions in experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.* 2012.

MAXIMIANO, F. P. et al. Benznidazole microcrystal preparation by solvent change precipitation and in vivo evaluation in the treatment of Chagas disease. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, n. 78, p. 377-384, 2011a.

MAXIMIANO, F. P. et al. Caracterização físico-química do fármaco antichagásicobenznidazol. *Química Nova*, n. 33, p. 1714-1719, 2010.

MAXIMIANO, F. P. et al. Development of effervescent tablets containing benznidazole complexed with cyclodextrin. *J. Pharm. Pharmacol.*, n. 63, p. 786-793, 2011b.

MICHELE, T. M. et al. Safety of chewable tablets for children. *J. Asthma*, n. 39, p. 91-403, 2002.

MONCAYO A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas' disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, n. 104, p. 17-30, 2009.

OPS. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Montevideo, Uruguay: Organización Panamericana de la Salud, 2006.

PINTO-DIAS, J.; SCHOFIELD, C. Social and Medical Aspects: Morbidity and Mortality in General Population. In: TELLERIA, J.; TIBAYRENC, M. *American Trypanosomiasis Chagas disease: one hundred years of research.* [S.l.]: First, 2010. p. 45-54.

RASENACK, N.; MÜLLER, B. W. Dissolution rate enhancement by in situ micronization of poorly water-soluble drugs. *Pharm. Res.*, n. 19, p. 1894-1900, 2002.

RASSI, J. R. A. ; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. M. Chagas' disease. *Lancet*, n. 375, p. 1388-1402, 2010.

SÁ BARRETO, L. C. L. et al. Modulated dissolution rate from the inclusion complex of antichagasic benznidazole and cyclodextrin using hydrophilic polymer. *Pharm. Dev. Tech.* En prensa, 2012. doi:10.3109/10837450.2011.644299.

SALOMON, C. J. First Century of Chagas' Disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *J. Pharm. Sci.* n. 101, p. 888-894, 2012.

SALOMON, C. J.; LAMAS, M. C.; SERRA, E. Una composición farmacéutica líquida de benznidazol. P 060104961. Patente en trámite, 2006.

SALOMON, C. J. et al. Una composición farmacéutica que comprende micropartículas poliméricas de liberación modificada, para la administración oral de benzimidazoles. P 090101989. Patente en trámite, 2009.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas' disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. n. 115, p. 14-21, 2010.

SINHA, V. R. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. Int. J. Pharm, n. 274, p. 1-33, 2004.

SOARES SOBRINHO, J. L. et al. Improving the solubility of the antichagasic drug benznidazole through formation of inclusion complexes with cyclodextrins. Quim. Nova, n. 34, p. 1534-1538, 2011.

SOSA ESTANI, S.; SEGURA, E. L. Etiological treatment in patients infected by Trypanosoma cruzi: experiences in Argentina. Curr. Opin. Infect. Dis., n. 19, p. 583-587, 2006.

Categoria Iniciação Científica

Menção Honrosa

MOSQUIFAIL: MODO PRÁTICO E DE BAIXO CUSTO
PARA EXTERMÍNIO DO *Aedes Aegypti*

Autor: David Richer Araujo Coelho, 16 anos, estudante da 2ª série do ensino médio no Colégio Municipal Francisco Porto de Aguiar

País: Brasil

MosquiFAIL: modo prático e de baixo custo para extermínio do *Aedes aegypti*

1. Resumo

O *Aedes aegypti*, vetor da epidemia que assola países da América do Sul como Brasil, Argentina e Paraguai, foi erradicado em 1950; no entanto, o mosquito voltou a se desenvolver e vem causando mortes e sofrimento, especialmente em meio à população mais carente. Não há vacina nem cura para a doença, apenas tratamento. A melhor forma de extinguir a moléstia é a prevenção. Além da conscientização da sociedade para não deixar água parada em pneus, vasos de plantas e vidros, entre outros, pode-se adotar uma forma prática e barata de combate à doença.

O MosquiFAIL (fracasso do mosquito *Aedes aegypti*) é construído com objetos domésticos de baixo custo financeiro, como caixa de leite, filó de trama fina, cola para aprisionar ratos e outros animais (chamada “pega tudo”), ração felina ou grãos de arroz, e jornais. Além dos benefícios que oferece, o produto é feito de materiais recicláveis, contribuindo para o desenvolvimento sustentável. Em sua camada superficial, situada três centímetros abaixo da borda superior da caixa, o MosquiFAIL é revestido com cola para prender ratos e insetos, cuja função é prender e matar o mosquito fêmea no momento da desova, impedindo, dessa forma, que continue transmitindo a dengue. A ração felina ou os grãos de arroz, localizados no fundo da caixa, atraem as larvas para a parte inferior, onde permanecem se alimentando. Ao emergir do estágio de pupa, o mosquito tenta fugir; no entanto, não consegue, morrendo de fome ou afogado.

Em suma, sendo utilizado de maneira extensiva e correta, o MosquiFAIL contribuirá significativamente para a melhoria das condições de salubridade na América do Sul, evitando, assim, mortes em massa e o padecimento das vítimas em decorrência da moléstia.

Palavras-chave: dengue, MosquiFAIL, prevenção, extinguir, mosquito, *Aedes aegypti*.

2. Apresentação

O *Aedes aegypti*, vetor da dengue e também da malária, foi introduzido na América durante o século 18, trazido por navios negreiros cujas condições permitiam sua proliferação, uma vez que seus ovos podem resistir até um ano sem entrar em contato com água.

Desde então, vem sendo causa de uma pandemia na América do Sul, em países como Paraguai, Brasil, Argentina e Uruguai. O mosquito macho alimenta-se exclusivamente de frutas, mas a fêmea precisa de sangue, essencial para fornecer as proteínas necessárias ao desenvolvimento dos ovos. A fêmea adquire o vírus quando pica um doente contaminado; após dez dias de incubação, o mosquito desenvolverá o vírus e se tornará vetor dele para sempre (vida média de 45 dias), podendo transmiti-lo para seus descendentes.

O *Aedes aegypti* é um mosquito urbano, adaptado a temperaturas entre 18°C e 32°C, aproximadamente (temperatura média dos países integrantes do MERCOSUL). Menor do que os mosquitos comuns, o *Aedes aegypti* é preto, com pequenos riscos brancos no dorso, nas pernas e na cabeça. Suas asas translúcidas produzem um ruído praticamente inaudível para o ser humano. Próprio das regiões tropical e subtropical (MERCOSUL), não resiste a baixas temperaturas nem a altitudes elevadas, e desenvolve-se por metamorfose completa. Seu ciclo de vida compreende quatro fases: ovo (depositado nas bordas dos recipientes), larva, pupa e adulto, que ocorrem em água parada limpa ou suja, em locais sombreados. A fêmea, vetor da doença, em geral ataca de manhã cedo ou ao entardecer e pica pés e tornozelos porque voa próximo do solo. Sua saliva possui uma substância anestésica, que torna quase indolor a picada.

Tendo em vista essa situação – a pandemia na América do Sul, o sofrimento enfrentado pelas vítimas da doença e a inexistência de uma vacina –, desenvolvi o projeto MosquiFAIL (fracasso do mosquito *Aedes aegypti*), que utiliza caixas de leite que usamos cotidianamente. O papel é uma opção preferível ao plástico (garrafas pet), porque demora menos tempo para se decompor; após a utilização do produto, é recomendável que as caixas sejam destinadas à coleta seletiva, pois sua reciclagem ainda é possível. A caixa de leite, que pode ser revestida com jornal para dar mais consistência, é tampada, perto da sua borda, com um pedaço de filó (13x10cm) de trama fina, do tipo usado em mosquiteiros ou telas de janelas, e é preenchida com água suja ou limpa (uma vez que o mosquito se desenvolve nos dois tipos de água)

contendo um grão de ração felina ou quatro grãos de arroz, alimentos que atrairão o mosquito vetor.

Levando em conta que o mosquito fêmea possivelmente já foi contaminado (sugou o sangue de um doente com o vírus e está em seu período de incubação ou tornou-se um vetor por contaminação da fêmea mãe) e, portanto, depois de colocar seus ovos, poderá voar e picar outras pessoas durante seus 45 dias de vida, desenvolvi um modo de capturar a fêmea utilizando a cola “pega tudo”, comprada por baixo custo em qualquer casa de ração. A parte superior do MosquiFAIL, de filó de trama fina, é revestida com a cola “pega tudo” (que prende ratos, insetos e aracnídeos), para que o mosquito fêmea fique preso durante e depois da postura. Quando se observar que o mosquito fêmea está grudado na cola, é recomendável matá-lo, pressionando-o com um objeto duro, ou simplesmente deixar que morra de fome, por esforço repetitivo ou asfixia. Sem essa armadilha, o *Aedes aegypti* colocaria seus ovos, voaria e picaria outras pessoas, sendo maior o risco na área onde foi colocada a armadilha, isto é, para as próprias pessoas que construíram o produto.

As demais funções do MosquiFAIL são impossibilitar que, depois de adultos, os mosquitos escapem, desenvolvam o vírus e o transmitam para outras vítimas. O filó de trama fina permite que os ovos sejam depositados, entrem em contato com a água (é muito importante observar se as larvas estão abaixo da trama de filó) e impede que os mosquitos já desenvolvidos saiam da caixa de leite, morrendo por falta de alimento. Opcionalmente, os mosquitos eclodidos podem ser eliminados com água sanitária, cloro ou veneno utilizado na área de combate ao mosquito.

O MosquiFAIL age, portanto, eliminando os novos mosquitos e também a fêmea que, depois de gerar descendentes, poderia picar outras pessoas. Se o produto fosse utilizado corretamente por todos, após algum tempo observaríamos uma grande diminuição no número de casos da doença devido à redução no número de fêmeas (não importando a alteração da quantidade de mosquitos machos, pois o mosquito vetor é apenas a fêmea), promovendo uma nova erradicação, tal como ocorreu no Brasil em 1950.

Para que o MosquiFAIL seja utilizado com bons resultados, é preciso que sejam mantidas as campanhas de conscientização da população sobre a necessidade de evitar água parada em suas casas.

O objetivo geral do projeto é a erradicação do *Aedes aegypti*, visto que há uma pandemia na América do Sul, não há vacinas e o inseto é causa de

sofrimento para as vítimas da doença. Além disso, gasta-se muito com o tratamento dos casos (bilhões de reais) e muitas mortes têm sido causadas pela dengue. A melhor solução é evitar a contaminação, por meio da eliminação do vetor e de seus descendentes.

Entre outras metas, os objetivos específicos são: capturar e exterminar os descendentes do mosquito vetor; prender o mosquito fêmea para que não continue a transmitir o vírus da doença; reaproveitar caixas de leite e jornal antes da reciclagem; gerar empregos para pessoas que trabalham com artesanato e trabalhos manuais.

3. Desenvolvimento

3.1. Materiais

O MosquiFAIL é muito prático e barato. Utilizado corretamente, pode ser administrado com bons resultados por qualquer pessoa.

Materiais:

- uma caixa de leite;
- uma tesoura;
- um vidro de cola;
- jornal;
- detergente, uma esponja e um pano seco;
- água;
- quatro grãos de arroz ou um grão de ração felina;
- um grampeador;
- um adesivo de cola “pega tudo”, comprado em alguns bazares e pela internet;
- pedaço de filó de trama fina, com 13x10cm (comprimento e largura, respectivamente);
- mistura de água sanitária e cloro, ou veneno usado pelos profissionais da saúde para extermínio das larvas (opcional: lembrar que há outras possibilidades de morte do mosquito);
- algum objeto duro (caneta, lápis, faca) para matar o mosquito que ficará grudado na fita (opcional).



Figura 1. (imagem feita com câmera fotográfica) Cola "Pega tudo" ou "Pega rato": prende ratos, aracnídeos e outros insetos, inclusive mosquitos, matando-os de fome, por esforço repetitivo e/ou asfixia.



Figura 2. (imagem feita com câmera fotográfica) Informações do verso da cola "Pega tudo".

3.2. Procedimento

1 - Cortar cerca de cinco centímetros da parte superior da caixa de leite. Ver como é feito o corte na figura abaixo, com a caixa já lavada.



Figura 3. Caixas de leite reaproveitadas depois da lavadas com detergente e água, para evitar micróbios (observar que o corte foi feito a poucos centímetros da parte superior da caixa).

2 - Lavar bem a caixa para eliminar o resíduo do leite e evitar micróbios. Usar detergente e esponja, e secar com um pano ou deixar exposta ao sol por algum tempo.

3 - Opcionalmente, encapar a caixa com jornal, para dar consistência. Decorá-la a gosto.



Figura 4. Caixas de leite embrulhadas com jornais usados.

4 - Colocar no fundo da caixa um grão de ração felina ou quatro grãos de arroz;

5 - Colocar o filó de trama fina, cortado nas medidas indicadas (13x10cm) três centímetros abaixo da borda superior da caixa, e grampeá-lo de modo que fique esticado. Os cantos devem ficar bem vedados para impossibilitar a fuga das futuras larvas.



Figura 5. MosquiFAIL com filó de trama fina grampeado para fixá-lo à caixa (observar a distância da borda em que o filó foi colocado).

6 - Manusear com atenção a cola “pega tudo”. Utilizar uma faca ou ferramenta dura para espalhar a cola (que é muito resistente) sobre toda a superfície externa do filó.



Figura 6 . MosquiFAIL com cola “pega tudo”. Observar toda a superfície acima do filó coberta com a cola (lembrar que o mosquito pousará sempre nas bordas).



Figura 7. MosquiFAIL na parte frontal; ao fundo, duas caixas de leite com filó.

7 - Encher a caixa com água até passar um pouco acima do filó de trama fina (isso permitirá que o mosquito fêmea deposite seus ovos com facilidade).



Figura 8. Observar até que ponto é colocada a água. Ver também a cola “pega tudo” nas bordas da caixa.

8 - A caixa está pronta. Colocar em lugar sombreado e repor a quantidade de água sempre que necessário. Observar regularmente se o mosquito fêmea já foi preso e se as larvas foram procurar alimento, passando para o fundo da caixa.



Figura 9. Depois de alguns dias de teste, é possível ver o mosquito fêmea preso (ao fundo da foto) e as larvas na parte inferior da caixa.



Figura 10. A foto evidencia a eficiência da cola e do filó de trama fina, provando que o MosquiFAIL pode levar ao extermínio da espécie.

9 - Opcional: matar o mosquito preso (de qualquer forma, ele morrerá por ficar sem alimento, por esforço repetitivo e/ou por asfixia após algum tempo). Fazer uma mistura de água sanitária e cloro para matar as larvas, ou aplicar o veneno utilizado pelos profissionais da saúde (de qualquer maneira, depois de algum tempo as larvas crescerão e se tornarão mosquitos, que morrerão sem alimento ou afogados).

10 - Atenção para que a caixa não seja derrubada: a água com larvas pode ser despejada, liberando a saída dos mosquitos.

Seguindo esses passos, você terá contribuído muito para que a espécie *Aedes aegypti* seja exterminada, para que vidas sejam salvas e para que sofrimentos sejam evitados.

3.3. Análise e debate

Iniciei o projeto no dia 2 de julho de 2012, recolhendo caixas de leite para meu experimento. No mesmo dia, lavei-as e coloquei-as expostas ao sol. No dia 3 de julho, encapei as caixas com jornais usados recolhidos na mesma data. No dia 4, coloquei o grão de ração felina com a função de atrair as larvas para o fundo da caixa, comprei o filó de trama fina, cortei na medida 13x10cm e o grampeei três centímetros abaixo da parte superior da caixa. Foi um trabalho muito prático! No dia 8 de julho, encontrei a cola que desejava – cola “pega tudo” ou “pega rato” – e a utilizei no dia 13 de julho, cobrindo toda a extensão da área de três centímetros acima do filó. No mesmo dia, enchi as caixas até pouco acima do filó e espalhei as caixas pela minha casa e pelas casas de meus vizinhos, pois já tinham ocorrido vários casos da doença em meu bairro. No dia 16 de julho, três dias depois de ter espalhado o MosquiFAIL pela vizinhança, tive uma ótima notícia: na casa de minha vizinha já se encontravam as larvas, agitadas como todas as outras; e o mosquito fêmea, preso, já nem tentava mais soltar-se daquela cola. Matei o mosquito no mesmo momento. A partir daí, passei a observar todos os dias as larvas na casa de minha vizinha. Enquanto isso, recebi outras notícias de que mais larvas tinham-se formado e mais mosquitos tinham sido presos, o que mostrou que minha região tinha alta incidência de *Aedes aegypti*. Depois de uma semana, no dia 23 de julho, observei pupas já formadas, que foram mantidas para continuidade da experiência. Três dias mais tarde, em 27 de julho, os mosquitos já estavam desenvolvidos e lutavam por um espaço na parte superior do filó. No entanto, não resistiram e morreram de fome ou afogados. O teste continuou com várias outras caixas, e constatei que o MosquiFAIL é capaz de eliminar tanto as larvas quanto o mosquito fêmea, evitando que novos mosquitos sejam criados e que a fêmea pique alguém, transmitindo a doença.

4. Conclusão

Além de eliminar as larvas do *Aedes aegypti*, interrompendo a fase final de seu desenvolvimento, o MosquiFAIL também prende e leva à morte o mosquito fêmea, para que este não transmita o vírus para outras pessoas. Portanto, se utilizado em massa e corretamente, o MosquiFAIL propiciará o extermínio da espécie, possibilitando a erradicação da pandemia que atinge a América do Sul e, consequentemente, para salvar muitas vidas e evitar o sofrimento de muitas vítimas. Entre outras qualidades, o

produto é muito prático e seu material custa muito pouco, podendo ainda gerar empregos na área de artesanato e outros trabalhos manuais. É uma oportunidade essencial para o combate ao mosquito. Uma vez que não há vacina, a única forma de prevenção é a eliminação da espécie vetora.

5. Referências bibliográficas

AMECAPE. Combate à dengue. [EUA]: CDC. Disponível em: <<http://www.amecape.org.br/servicos/dengue01.htm>>. Acesso em: 25 mai. 2012

CUNHA, Rivaldo Venâncio da. Dengue e dengue hemorrágico. Dourados, 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/kkitdengue/parasabermals/textos/Palestra%20ACS_ACV_Dourados_08_02_07.pdf>. Acesso em: 21 mai. 2012.

DENGUE.ORG.BR. Mapas da dengue. Disponível em: <http://www.dengue.org.br/dengue_mapas.html>. Acesso em: 25 mai. 2012.

DENGUE.ORG.BR. Mapas da dengue, 2007. Disponível em: <http://www.dengue.org.br/mapa_mundo_dengue2007.jpg>. Acesso em: 25 mai. 2012.

FERREIRA, Pablo Pires. O vetor do dengue. Agência Fiocruz de Notícias, especial dengue. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/especiais/dengue/dengue_vetor.htm>. Acesso em: 25 mai. 2012.

INSTITUTO DE SAÚDE DO PARANÁ. Transmissor da febre da dengue e da febre amarela - *Aedes aegypti* (1894). Disponível em: <http://saude.londrina.pr.gov.br/intranet/departamentos/informatica/_html_/download/apresentacao2_diaD.pdf>. Acesso em: 21 mai. 2012.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Dengue: vírus e vetor; *Aedes* e dengue: vetor e doença. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/aedesvetoredoenca.html>>. Acesso em: 29 mai. 2012.

LIXO.COM.BR. Tempo de decomposição: tempo (aproximado) de decomposição de materiais. Disponível em: <http://www.lixo.com.br/index.php?Itemid=252&id=146&option=com_content&task=view>. Acesso em: 21 mai. 2012.

MERCADO LIVRE. Cola pega rato. Disponível em: <http://produto.mercadolivre.com.br/MLB-241672670-cola-pega-rato-_JM>. Acesso em: 31 mai. 2012.

NATUREZA BRASILEIRA. Armadilha para pegar o mosquito da dengue. 2008. Disponível em: <<http://natureza-brasileira.blogspot.com.br/2008/03/mosquitrio-uma-armadilha-para-mosquitos.html>>. Acesso em: 29 mai. 2012.

Categoria Estudante Universitário

Menção Honrosa

A BIOLOGIA SINTÉTICA PARA A PRODUÇÃO DE UM BIOFÁRMACO PARA HEMOFILIA A.

Autor: Angelo Luis Caron, 23 anos, estudante do 8º semestre de Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP)

Professora-orientadora: Aparecida Maria Fontes, Hemocentro de Ribeirão Preto (FMRP/USP)

País: Brasil

A Biologia Sintética para a produção de um biofármaco para hemofilia A

Resumo

A hemofilia A é uma doença genética ligada ao cromossomo X, causada pela deficiência do fator VIII da coagulação sanguínea (FVIII). Os tratamentos atuais consistem na terapia de reposição com fator VIII derivado do plasma (FVIII_{dp}) ou fator VIII recombinante (FVIII_r), que apesar das vantagens, como a redução dos riscos de contaminações virais, é caro e de aquisição limitada na maior parte dos países em desenvolvimento. A emergente área da Biologia Sintética pode permitir o desenvolvimento de produtos biofarmacológicos de maneira rápida e eficiente. A obtenção do primeiro organismo procarioto por biologia sintética levou-nos à hipótese de que a mesma poderia ser utilizada para a síntese do FVIII funcional. Em colaboração com os pesquisadores do Instituto Venter, foi desenvolvida uma construção lentiviral portadora de duas sequências sintéticas: FVIII, com o domínio B parcialmente deletado; e o gene Neomicina, que confere resistência à geneticina. Em seguida, foi realizada a produção em larga escala dessa partícula lentiviral, que foi utilizada para transduzir a linhagem celular humana SK-HEP-1. Após múltiplos ciclos de infecção e tratamento com geneticina, obtivemos duas linhagens celulares produtoras de elevados níveis do FVIII sintético da coagulação: SK-HEP-SintFVIII_{WT} Δ B-MOI6 e SK-HEP-SintFVIII_{WT} Δ B-MOI20. Essas linhagens celulares foram caracterizadas quanto à expressão estável do RNAm do FVIII, por RT-qPCR e quanto ao nível de proteína do FVIII pelos ensaios cromogênico, APTT e ELISA. A produtividade detectada para as linhagens foi $1,33 \pm 0,02$ UI FVIII/ 10^6 células e $2,69 \pm 0,46$ UI FVIII/ 10^6 células, respectivamente. Dessa forma, demonstramos que a Biologia Sintética é uma tecnologia promissora para a produção de um biofármaco para hemofilia A, e abre perspectivas para aplicações futuras em outras doenças monogênicas.

Introdução

A hemofilia A é uma doença hereditária ligada ao cromossomo X, causada pela ausência ou anormalidade do fator VIII da coagulação sanguínea (FVIII) (GRAW, BRACKMANN et al., 2005). É uma das desordens hemorrágicas mais prevalentes. Atinge cerca de 400 mil pessoas em todo o mundo e ocorre em cerca de um a cada cinco mil nascimentos masculinos (SCHAU, 2011). Os sintomas clínicos são caracterizados por sangramentos espontâneos e pós-trauma. Os sangramentos podem ocorrer em articulações (hemartroses), músculos (hematomas) e órgãos internos (GRAW, BRACKMANN et al., 2005). Em indivíduos saudáveis, os níveis de atividade do FVIII no plasma estão entre 100 e 200ng.ml⁻¹ (GRAW, BRACKMANN et al. 2005). Com essa referência, é possível classificar os níveis de hemofilia A em grave (< 1% de atividade), moderada (2%-5% de atividade) e leve (5%-30% de atividade). Esses diferentes níveis de hemofilia ocorrem em uma proporção de 40%, 10% e 50%, respectivamente (GRAW, BRACKMANN et al., 2005).

O tratamento atual para hemofilia A consiste na terapia de reposição, com a administração da proteína do fator VIII derivado do plasma (FVIII_{dp}) ou recombinante (FVIII_r). Os tratamentos com proteínas recombinantes tiveram início por volta de 1993, quase uma década após a descrição, em 1984, da sequência do gene do FVIII, a mais longa até então (GRAW, BRACKMANN et al., 2005). Entretanto, em muitos países desenvolvidos e em praticamente todos os países em desenvolvimento, o tratamento é feito principalmente com FVIII_{dp}, que oferece desvantagens, tais como fonte limitada dependente de doação de sangue, risco de contaminações virais, entre outros (DUROCHER, BUTLER, 2009). Além disso, poucos pacientes recebem tratamento do tipo profilático – que consiste na infusão contínua do fator de coagulação –, predominando o tratamento de demanda – que consiste na infusão venosa periódica do fator de coagulação após um episódio hemorrágico (CARCAO, ALEDORT, 2004; POWELL, 2009).

O tratamento profilático pode ser feito pelo próprio paciente em sua casa, e garante melhor qualidade de vida. Há redução do número de sangramentos nas articulações e em outros locais, inclusive sangramento intracranial, redução das dores musculares, redução do número de internações hospitalares, melhor desempenho escolar e profissional, redução do desenvolvimento de inibidores no plasma sanguíneo, entre outros benefícios (CARCAO, ALEDORT, 2004; PIPE, 2009).

Nos países do MERCOSUL, como Argentina, Brasil e Venezuela, a aquisição de fatores abrange a maior parte dos pacientes registrados, e novas licitações são feitas anualmente para a compra de fatores. Entretanto, os custos de um tratamento adequado são elevados. No Brasil, para tentar garantir a profilaxia primária aos pacientes assistidos pelo SUS (Sistema Único de Saúde), o Ministério da Saúde adquiriu 640 milhões de UI (Unidades Internacionais) para o ano de 2012, e 210 milhões de UI para o primeiro trimestre de 2013, com um investimento financeiro total de R\$522 milhões (GARCIA, 2011). Mesmo nesse contexto, a utilização do fator VIII recombinante é mínima, devido ao alto custo para sua aquisição: cerca de US\$1 por unidade internacional contra US\$0,20 a US\$0,25 por unidade do FVIII_{dp} (CGEE, 2006).

O desenvolvimento de novas moléculas da coagulação e de plataformas mais eficientes de produção da proteína do FVIII poderia resultar em menor custo final do produto. Com isso, os pacientes teriam acesso a um produto mais seguro (DA ROSA, SWIECH et al., 2012) e ao tratamento profilático recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde), atingindo uma qualidade de vida equivalente à de uma pessoa não hemofílica.

A ciência da Biologia Sintética emergiu na era em que o sequenciamento de genomas emergiu, permitindo a engenharia de partes ou sistemas biológicos. Essa inovação foi aplicada em diversas áreas. Na área da saúde, a Biologia Sintética surge como uma plataforma biotecnológica para o desenvolvimento de vetores sintéticos e vem trazendo importantes contribuições em várias áreas, como oncologia, imunologia e microbiologia (RUDER, LU et al., 2011).

Esse conjunto de estudos conduziu-nos à hipótese de que a integração da Biologia Molecular e Celular e da Virologia com a Biologia Sintética permitiria o desenvolvimento do primeiro biofármaco sintético da coagulação que poderia ser utilizado na terapia de reposição para hemofilia A.

Utilizando um sistema eficiente de transdução, como o lentiviral, que permite a inserção da sequência de interesse no genoma da célula em regiões não deletérias (NALDINI, 2011; SPENCER, DENNING et al., 2011), este estudo visou a obtenção de uma linhagem celular humana produtora de altos níveis da proteína funcional do FVIII Δ B sintético após múltiplos ciclos de transdução lentiviral, seguida da seleção com geneticina da linhagem celular transgênica.

Material e métodos

Produção do vetor lentiviral

Todas as linhagens celulares utilizadas foram cultivadas em placa de cultura contendo meio D-MEM (Life Technologies, MD, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal, e 10% de antibióticos penicilina e estreptomicina a 37°C e 5% CO₂.

O vetor sintético lentiviral de terceira geração foi gerado por meio da transfecção da linhagem celular humana 293FT, utilizando o reagente Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), com os plasmídeos: pLVm_{psv}FVIIIΔB-Neo (contendo as sequências sintéticas do cDNA do FVIII selvagem com o domínio B parcialmente deletado e da Neomicina); 8.91 (portador das proteínas do capsídeo); e VSV-G (portador das proteínas do envelope viral). O sobrenadante viral resultante foi coletado e concentrado por centrifugação a 40.000 x g por cem minutos a 4°C. O título viral foi calculado por qPCR em termociclador ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Boston, MA, EUA).

Transdução da linhagem celular humana SK-HEP-1

Foram realizados sete ciclos de transdução em intervalos de 24 horas na linhagem celular humana SK-HEP. Uma população celular recebeu MOI 6 em todos os ciclos, e outra recebeu MOI 5 até o ciclo 5, MOI 10 no ciclo 6 e MOI 20 no ciclo 7 (SPENCER, DENNING et al. 2011). Para facilitar a passagem do vírus pela membrana plasmática, foram adicionados ao meio de cultura 8µg/ml de polybrene (1,5-dimetil-1,5-diazaundecametileno polimetobromida, hexadimetrine bromida, Sigma). Esse polímero neutraliza as cargas negativas encontradas na superfície da membrana celular, diminuindo a repulsão eletrostática. Após cada ciclo de transdução, o sobrenadante lentiviral foi retirado, as células foram lavadas com PBS 1X e colocadas em cultivo com meio fresco por 24 horas. Passado esse período, as células foram replaqueadas para o ciclo seguinte.

Caracterização da população de células SK-HEP-SintFVIIIWTΔB

Por fim, as células foram tratadas durante dez dias com o antibiótico geneticina em uma concentração de 1.800µg/ml, visando à obtenção de uma população celular que contivesse a sequência da Neomicina sintética e, conseqüentemente, do FVIII sintético.

As populações resultantes foram cultivadas em placas de 100cm de diâmetro e caracterizadas quanto a níveis de expressão do RNAm, por PCR em tempo real e níveis de atividade da proteína funcional do fator VIII presente no sobrenadante das culturas celulares, pelos ensaios cromogênico, aPTT e ELISA. O sobrenadante utilizado foi recolhido após 24 horas em cultura e armazenado em freezer a -80°C até o momento dos ensaios de atividade.

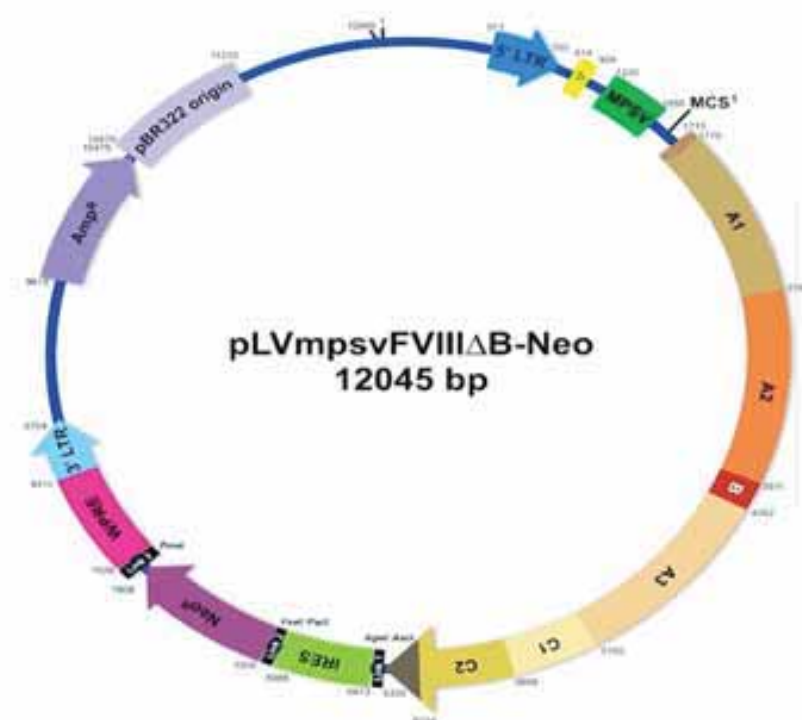
Forma de análise dos resultados

Todas as análises do projeto foram realizadas em triplicata. As análises estatísticas foram feitas com o programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA), com valor p fixado em 0,05. Foram feitos testes de ANOVA e teste de correlação de Pearson.

Resultados e discussão

Iniciamos o estudo com o desenvolvimento de um vetor lentiviral sintético em colaboração com o grupo de pesquisa do Instituto John Craig Venter. O vetor possui 12.045 pares de bases e é portador da sequência sintética do FVIII com o domínio B parcialmente deletado e o gene da Neomicina (Fig. 1). Diversos estudos relatam um maior nível de expressão do cDNA do FVIII com o domínio B parcialmente deletado em relação ao tipo selvagem (DORNER, BOLE et al., 1987; PITTMAN, ALDERMAN et al. 1993; MIAO, SIRACHAINAN et al., 2004).

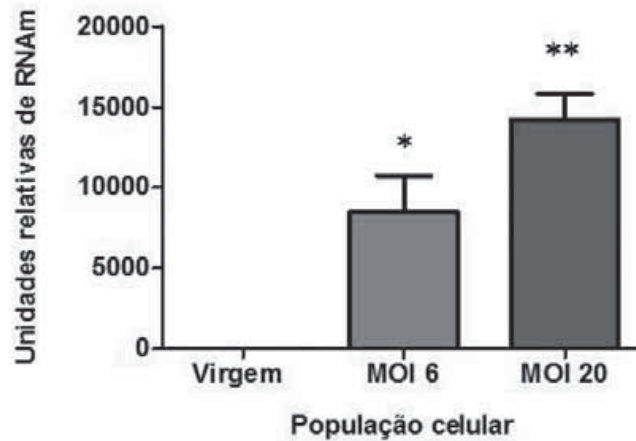
Figura 1. Vetor lentiviral pLVm_{psv}FVIII Δ B-Neo portador das seqüências sintéticas do FVIII com o domínio B parcialmente deletado e o gene da Neomicina.



Após a produção em larga escala da partícula viral pLVm_{psv}FVIII Δ B-Neo, foram geradas duas linhagens celulares humanas portadoras, em seu genoma, do FVIII sintético da coagulação: SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI6 e SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI20.

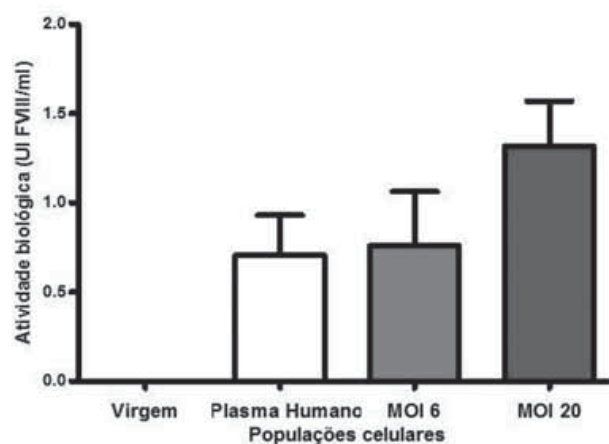
Primeiramente, essas linhagens celulares foram caracterizadas por qPCR quanto ao nível de RNAm relativo ao FVIII. O resultado da análise de expressão estável do RNAm do FVIII nas células SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI6 e SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI20 foi $8.505,00 \pm 2.179,00$ e $14.206,00 \pm 1.590,00$ vezes superior aos níveis encontrados na célula virgem, respectivamente (Fig. 2).

Figura 2. Níveis relativos de expressão estável do RNAm do FVIII em SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI6 (MOI 6) e SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI20 (MOI 20) após 24 horas em cultura. Os níveis encontrados para as células SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI20 foram estatisticamente mais altos do que os níveis das populações MOI 6 e virgem (**), e os de MOI 6 foram mais altos do que os níveis das populações virgens (*) (P<0,0001).



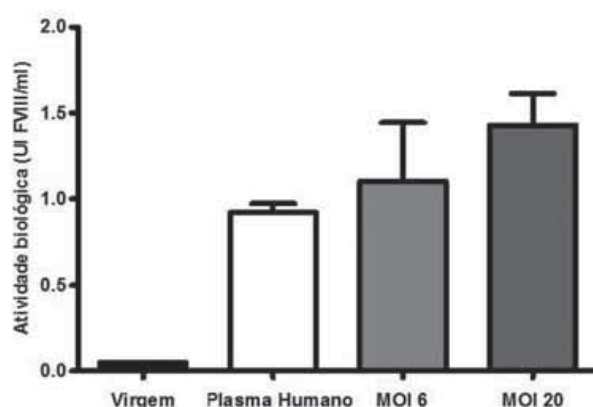
Em seguida, a proteína do FVIII funcional presente no sobrenadante dessas culturas celulares foi avaliada pelos ensaios cromogênico, APTT e ELISA. No ensaio cromogênico foram detectadas atividade de $0,80 \pm 0,32$ UI FVIII/ml e produtividade de $1,33 \pm 0,02$ UI FVIII/ 10^6 células na população SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI6, e atividade de $1,31 \pm 0,26$ UI FVIII/ml e produtividade de $2,69 \pm 0,46$ UI FVIII/ 10^6 células na população SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI20. O valor de atividade detectado no plasma humano foi de $0,70 \pm 0,22$ UI FVIII/ml, e, nas populações de células virgens, os níveis de atividade não foram detectáveis (Fig. 3).

Figura 3. Níveis de atividade (UI FVIII/ml) do FVIII em SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI6 e SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI20 em sobrenadante após 24 horas em cultura, pelo ensaio cromogênico. Os níveis encontrados para ambas as populações e para o plasma humano foram estatisticamente equivalentes (P<0,0008).



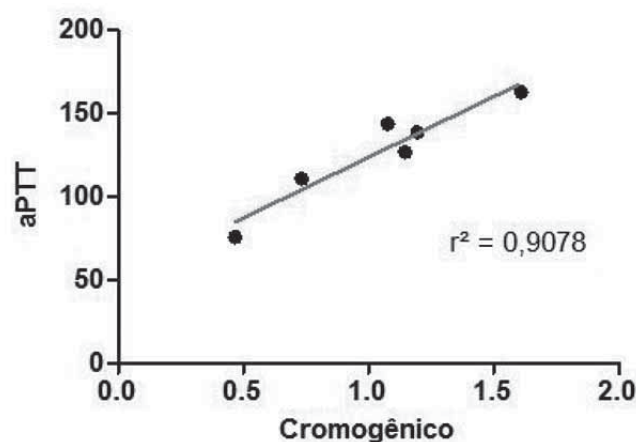
No ensaio aPTT (Tempo de Tromboplastina Parcial ativada), a população SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI6 mostrou atividade de $127,33 \pm 16,50\%$, enquanto a população SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI20 mostrou atividade de $133,30 \pm 6,03\%$. A atividade nas células virgens foi de 5%, ao passo que o plasma humano mostrou $92 \pm 0,05\%$ de atividade. O valor de 100% de atividade é considerado como sendo uma Unidade Internacional (Fig. 4).

Figura 4. Níveis de atividade (UI FVIII/ml) do FVIII em SK-HEP-SintFVIIIWT Δ - MOI 6 e SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI20 em meio de cultura de 24 horas, pelo ensaio aPTT. Os níveis encontrados para ambas as populações e para o plasma humano foram estatisticamente equivalentes ($P < 0,0001$).



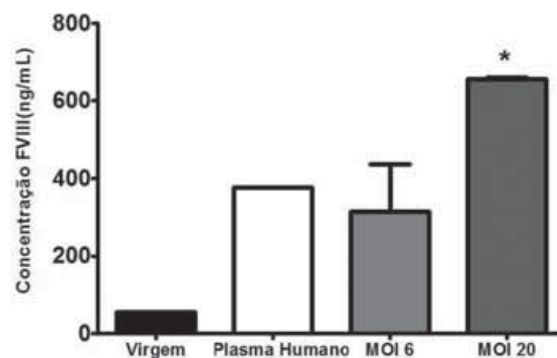
Os resultados obtidos para os ensaios cromogênico e aPTT foram submetidos ao teste de Pearson, que mostrou forte correlação ($P < 0,0033$) (Fig. 5).

Figura 5. Gráfico de correlação de Pearson (r) entre os ensaios cromogênico e aPTT ($P < 0,0033$).



Com o ensaio ELISA (Enzyme-linked immuno sorbent assay), foi possível mensurar as concentrações da proteína do FVIII nos sobrenadantes. Foram encontrados valores de $314,27 \pm 121,82$ ng FVIII/ml e $655,14 \pm 4,91$ ng FVIII/ml nas populações de SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI6 e SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI20, respectivamente. A concentração detectada nas células virgens foi de $55,46 \pm 0,13$ ng FVIII/ml e a concentração de FVIII no plasma humano foi de 376,53 ng FVIII/ml (Fig. 6).

Figura 6. Gráfico de concentração da proteína do FVIII no sobrenadante de 24 horas de cultura (ng/ml) pelo ensaio ELISA. Os níveis encontrados para as células SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI20 foram estatisticamente mais altos ($P < 0,0001$) do que os níveis das populações SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI6 e do plasma humano (*); os níveis da população SK-HEP-SintFVIIIWT Δ B-MOI6 foram estatisticamente equivalentes aos níveis encontrados no plasma humano.



No presente estudo, foi gerada uma população celular com níveis de produção equivalentes aos encontrados no plasma humano, empregando duas estratégias principais: a utilização do sistema lentiviral para integração das sequências no genoma das células-alvo; e a utilização de sequências sintéticas do gene da Neomicina e do FVIII com o domínio B parcialmente deletado.

Com a descoberta da dupla-hélice do DNA por Watson e Crick (1953), emergiu a era da Genética Molecular, também conhecida como era do DNA recombinante ou Engenharia Genética. O marco foi o desenvolvimento da primeira molécula recombinante pelo grupo do Professor Paul Berg, que desenvolveu uma molécula híbrida contendo fragmentos de DNA do SV-40 (vírus do símio 40) com o DNA do fago lambda (JACKSON, SYMONS et al., 1972; MORROW E BERG, 1972). Em uma compilação realizada pelo Professor Ronald Rader, do Instituto Americano de Biotecnologia, verificou-se que, no ano de 2008, 125 proteínas recombinantes já haviam sido aprovadas

pela agência regulatória norte-americana FDA (Food and Drug Administration) ou pela União Europeia, e que milhões de pessoas em todo o mundo tinham-se beneficiado dos produtos recombinantes (RADER, 2008).

Ainda na era do DNA recombinante, quase três décadas depois da primeira molécula recombinante, dois grupos norte-americanos revelam uma das maiores conquistas do século atual: o sequenciamento do genoma humano (LANDER, LINTON et al., 2001; VENTER, ADAMS et al., 2001). Esse marco permitiu uma visão mais abrangente do genoma humano e uma nova compreensão sobre o funcionamento de muitas doenças; e tornou possível o desenvolvimento de muitas ferramentas de diagnóstico, medidas preventivas e métodos terapêuticos.

Esses avanços científicos e tecnológicos permitiram o surgimento de uma nova era nos campos da biologia e da medicina – a era da Biologia Sintética. Em 2010, o grupo de pesquisadores do Instituto John Craig Venter desenvolveu o primeiro organismo procaríoto com o genoma inteiramente sintético – a bactéria *Mycoplasma mycoides* –, capaz inclusive de se replicar (GIBSON, GLASS et al. 2010). Mais recentemente, em 2011, um grupo de pesquisadores da Universidade John Hopkins realizou a síntese parcial de dois cromossomos do organismo *Saccharomyces cerevisiae*, as primeiras sequências sintéticas de um organismo eucarioto (DYMOND, RICHARDSON et al. 2011).

O presente estudo mostrou ser possível a geração de uma linhagem celular portadora em seu genoma de duas sequências sintéticas: o cDNA do FVIII com o domínio B parcialmente deletado (FVIII Δ B) e o gene da Neomicina. A segunda estratégia empregada neste estudo foi o uso do sistema lentiviral para integrar as sequências sintéticas no genoma das células após múltiplos ciclos de transdução.

Diversos estudos têm utilizado o sistema lentiviral como eficiente carregador da sequência de interesse em diversos tipos celulares (SHICHINOHE, BOCHNER et al., 2001; SPENCER, DENNING et al., 2011; WARD, BUCKLEY et al., 2011; DA ROSA, SWIECH et al., 2012), por dois motivos principais: possibilita a geração de uma linhagem celular com produção permanente da proteína de interesse e permite a integração de várias cópias do transgene devido a seu perfil mais seguro de integração (NALDINI 2011; SPENCER, DENNING et al. 2011). Com a utilização dessa tecnologia, foi possível submeter a população de SK-HEP-1 a múltiplos ciclos de transdução, visando a um alto número de cópias integradas e, assim, elevados níveis de produção permanente da proteína sintética do FVIII.

Na área da hemofilia, inexistem estudos que tenham agregado a Biologia Molecular e Celular e a Virologia à Biologia Sintética. Assim, este estudo é o primeiro a promover essa integração, resultando no desenvolvimento de uma linhagem celular humana com níveis permanentes de produção da proteína sintética do FVIII da coagulação.

Conclusões

A Biologia Sintética é uma estratégia viável para a geração de novas moléculas funcionais, como as de FVIII e Neomicina. Além disso, utilizando o sistema de transdução lentiviral foi possível a obtenção de duas populações celulares humanas de SK-HEP-1 com níveis de produção permanente do FVIII equivalentes àqueles encontrados no plasma sanguíneo.

A validação da funcionalidade de uma molécula produzida sinteticamente amplia a gama de estratégias que podem ser utilizadas nos campos de estudo da hemofilia. Novas sequências podem ser construídas portando alterações que busquem potencializar a expressão do FVIII pelas células, além de amenizar, ou mesmo eliminar, o desenvolvimento de inibidores da proteína quando *in vivo*. De modo geral, a Biologia Sintética extrapola os limites dos estudos sobre hemofilia e mostra-se uma alternativa viável para estudos relacionados a outras doenças monogênicas cujo tratamento consiste na reposição da proteína deficiente.

Considerações adicionais

O autor agradece ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas (Diretor-presidente do Hemocentro de Ribeirão Preto e coordenador do projeto); Prof. Dr. John Craig Venter e Dr. Daniel Gibson (Pesquisadores do Instituto John Craig Venter – Califórnia, USA); Lucas Eduardo Botelho de Souza e Ricardo Bonfim-Silva (Laboratório de Transferência Gênica), Gil Cunha De Santis (Gerente Médico), Mauricio Cristiano Rocha Junior (Laboratório de Biologia Molecular), Anemari Ramos Dinarte dos Santos (Laboratório de Genética Molecular), Maria Angela P. Ottoboni (Laboratório de Controle de Qualidade).

Agradece às agências fomentadoras: Agência FAPESP pelo auxílio da bolsa de Iniciação Científica (Processo nº 2012/00839-8); FINEP (Grant #01.07.0652.00); e CNPq (Grant # 314458/2009-3).

Referências bibliográficas

CARCAO, M. D.; ALEDORT, L. Prophylactic factor replacement in hemophilia. *Blood Rev*, v. 18, n. 2, p. 101-13, 2004.

CGEE. Hemoderivados, 2006.

DA ROSA, N. G. et al. SK-HEP cells and lentiviral vector for production of human recombinant factor VIII. *Biotechnol Lett*, v. 34, n. 8, p. 1435-43, 2012.

DORNER, A. J. et al. The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol*, v. 105, n. 6, pt. 1, p. 2665-74, 1987.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol*, v. 20, n. 6, p. 700-7, 2009.

DYMOND, J. S. et al. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature*, v. 477, n. 7365, p. 471-6, 2011.

GARCIA, N. SUS garante tratamento preventivo para hemofílicos. 2011, Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3763/162/sus-garante-tratamento-preventivo-para-hemofílicos.html>>.

Acesso em: 10 ago. 2012.

GIBSON, D. G. et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, v. 329, n. 5987, p. 52-6, 2010.

GRAW, J. et al. Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies. *Nat Rev Genet*, v. 6, n. 6, p. 488-501, 2005.

JACKSON, D. A. et al. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 69, n. 10, p. 2904-9, 1972.

LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

MIAO, H. Z. et al. Bioengineering of coagulation factor VIII for improved secretion. *Blood*, v. 103, n. 9, p. 3412-9, 2004.

MORROW, J. F.; BERG, P. Cleavage of Simian virus 40 DNA at a unique site by a bacterial restriction enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 69, n. 11, p. 3365-9, 1972.

- NALDINI, L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet*, v. 12, n. 5, p. 301-15, 2011.
- PITTMAN, D. D. et al. Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. *Blood*, v. 81, n. 11, p. 2925-35, 1993.
- POWELL, J. S. Recombinant factor VIII in the management of hemophilia A: current use and future promise. *Ther Clin Risk Manag*, v. 5, n. 2, p. 391-402, 2009.
- RADER, R. A. (Re)defining biopharmaceutical. *Nat Biotechnol*, v. 26, n. 7, p. 743-51, 2008.
- RUDER, W. C. et al. Synthetic biology moving into the clinic. *Science*, v. 333, n. 6047, p. 1248-52, 2011.
- SCHAUB, R. G. Recent advances in the development of coagulation factors and procoagulants for the treatment of hemophilia. *Biochem Pharmacol*, v. 82, n. 2, p. 91-8, 2011.
- SHICHINOHE, T. et al. Development of lentiviral vectors for antiangiogenic gene delivery. *Cancer Gene Ther*, v. 8, n. 11, p. 879-89, 2001.
- SPENCER, H. T. et al. Lentiviral vector platform for production of bioengineered recombinant coagulation factor VIII. *Mol Ther*, v. 19, n. 2, p. 302-9, 2011.
- VENTER, J. C. et al. The sequence of the human genome. *Science*, v. 291, n. 5507, p. 1304-51, 2001.
- WARD, N. J. et al. Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression. *Blood*, v. 117, n. 3, p. 798-807, 2011.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, v. 171, n. 4356, p. 737-8, 1953.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, n.18, p. 123-31, 1953.

Categoría Joven Investigador

Mención Honrosa

PARTICIPACIÓN DE CÉLULAS PLURIPOTENTES
DE MÉDULA ÓSEA EN EL PROCESO DE
DEGENERACIÓN-REGENERACIÓN NERVIOSA

Autora: Vanina Usach, 31 años, doctoranda en Neurociencias
na Universidade de Buenos Aires (UBA)

País: Argentina

Participación de células pluripotentes de médula ósea en el proceso de degeneración-regeneración nerviosa

Resumen

Pese a la alta capacidad de regeneración de los nervios periféricos, las lesiones que sufren suelen tener una evolución clínica poco satisfactoria. En los últimos años, la terapia celular ha surgido como una alternativa para el tratamiento de diversas patologías y la recuperación de los tejidos dañados. El objetivo del presente trabajo es evaluar si las células mononucleares de médula ósea (CMMO) tienen la capacidad de favorecer la regeneración del nervio ciático lesionado. Para ello se trabaja con un modelo de degeneración walleriana (DW) reversible, que permite evaluar los efectos de las CMMO tanto en el periodo de degeneración como en el de regeneración. Hemos demostrado previamente que la etapa de desmielinización se mantiene hasta los 21 días, momento en el cual comienza la remielinización. Durante este proceso, hay migración espontánea de CMMO tanto endógenas como trasplantadas por vía sistémica, las cuales colocalizan con marcadores de células de Schwann (CS) y de fibra nerviosa. En este trabajo se evaluó el efecto que las CMMO tienen en el proceso de degeneración-regeneración, demostrando que el tratamiento provoca una degeneración acelerada y, consecuentemente, una regeneración más veloz. Debido al gran efecto benéfico observado y al escaso porcentaje de células transdiferenciadas demostrado, se sugiere que las CMMO ejercerían un efecto neuroinmunomodulador. Los resultados obtenidos sugieren que las CMMO son buenas candidatas para ser utilizadas en estrategias que favorezcan la recuperación de nervios periféricos lesionados. Aún queda por determinar el momento ideal para la realización del trasplante y las señales biológicas que participarían en el reclutamiento de las CMMO.

Introducción

Las CMMO representan un grupo heterogéneo de células, que incluye tanto células estromales (CEMO), células madre hematopoyéticas (HSC) (ORKIN, 2000; WEISSMAN; ANDERSON; GAGE, 2001), precursores hematopoyéticos [WEISSMAN; ANDERSON; GAGE, 2001] y precursores endoteliales (WANG et al., 2008). Cabe destacar que dentro de las CEMO existe una fracción minoritaria de células pluripotentes conocida como células madre progenitoras adultas (MAPS). Los tipos celulares previamente mencionados producen numerosas citoquinas y factores tróficos, tales como el factor de crecimiento neural (NGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico derivado de células gliales (BDGF), que pueden promover la recuperación de varios tipos de lesiones.

Tanto las CEMO como las HSC pueden ser quimioatraídas a los tejidos lesionados, donde producen y liberan algunos de los factores antes mencionados (KRAUSE et al., 2001; CHOPP; LI, 2002; CRAIN; TRAN; MEZEY, 2005; SHYU et al., 2006). Por su parte, las células precursoras endoteliales pueden contribuir a la resvascularización de tejidos afectados por isquemias, así como contribuir a la reparación del endotelio lesionado (WANG et al., 2008; KAWAMOTO; LOSORDO, 2008, YIP et al., 2008).

Teniendo en cuenta estas propiedades, varios grupos en el mundo han demostrado el efecto benéfico de estas células tanto en roedores (PETERSEN et al, 1999; THEISE et al., 2000) como en humanos (THEISE et al., 2000; ALISON et al., 2000a). En modelos de daño hepático, las CMMO son capaces de diferenciarse a hepatocitos; mientras que en modelos de infarto de miocardio son capaces de dar origen a miocitos y/o producir citoquinas que permitan la regeneración del músculo cardíaco (ORLIC et al., 2001). En relación con el sistema nervioso, son capaces de promover angiogénesis, neuroprotección y neuroregeneración en varios modelos de lesiones del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico (SNP) (PIMENTEL-COELHO; MENDEZ-OTERO, 2010; GIRALDI-GUIMARAES et al., 2009; PIMENTEL-COELHO et al., 2010; RIBEIRO-RESENDE et al., 2009; NAKANO-DOI et al., 2010; VASCONCELOS DOS SANTOS et al., 2010; ZAVERUCHA-DO-VALLE et al., 2011). Tanto la microinyección de CEMO a partir de ratones que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) como el trasplante sistémico de CMMO fueron capaces de inducir la remielinización en un modelo de daño a la médula espinal (AKIYAMA et al., 2002a; AKIYAMA et al., 2002b).

En nuestro laboratorio, hemos demostrado que las CMMO migran, ya sea de manera espontánea o luego de un trasplante por vía sistémica, exclusivamente hacia el nervio ciático lesionado, tanto en un modelo de DW irreversible como en uno reversible (SETTON-AVRUJ et al., 2007; USACH et al., 2011). Por otra parte, una vez instaladas en el nervio dañado, colocalizan con el marcador axonal PGP 9.5 y con marcadores de CS como son S100 β y MBP (USACH et al., 2011). La migración observada podría ser con el fin de participar en el proceso de degeneración-regeneración, ya sea mediante su transdiferenciación en células neurales (USACH et al., 2011; DEZAWA et al., 2001; CUEVAS et al., 2004; MIMURA et al., 2004; ZHANG et al., 2004) o mediante la liberación de factores tróficos, citoquinas y quemoquinas que contribuyan con el proceso de regeneración. El efecto benéfico podría ser debido a la presencia de precursores de monocitos y monocitos maduros dentro de la fracción trasplantada. Estos monocitos podrían aumentar el número de macrófagos en el área lesionada y de este modo, acelerar la eliminación de los restos de mielina y axones generados como consecuencia de la DW, paso esencial para una remielinización completa. Por otra parte, las CMMO podrían aumentar la cantidad de factores neuroinmunomoduladores en la región y, de esta forma, inducir un efecto neuroprotector y/o el crecimiento axonal.

Conocer los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de regeneración del SNP y el papel que las células pluripotentes tienen en este contexto, es esencial para idear terapias que faciliten la recuperación completa luego de una lesión.

Objetivos

Sobre la base de lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo es evaluar cuál es el efecto que las CMMO, que migran hacia el nervio lesionado, tienen sobre el proceso de degeneración-regeneración. Se utiliza un modelo de lesión del nervio ciático, promovido por la compresión del mismo. Se trata de un modelo reversible, que en una primera etapa demuestra desmielinización y degeneración de la fibra nerviosa y que a sobrevidas mayores evidencia una remielinización y regeneración espontánea, que permite estudiar la participación de las CMMO tanto en la etapa de degeneración como en la de regeneración. Teniendo en cuenta esto, se

plantean como objetivo específico determinar la función de las CMMO en el nervio dañado, para evaluar si participan en la remoción de la mielina degradada y la posterior remielinización del nervio lesionado o si actúan exclusivamente como agentes fagocíticos, acelerando la degradación de la mielina y los axones degenerados. Para ello se utilizarán como marcadores de mielina sus proteínas mayoritarias, MBP y P₀, y, como marcador de la fibra nerviosa, PGP 9.5.

Materiales y métodos

Los siguientes materiales fueron adquiridos en Sigma Chem. Co (San Luis, Misuri, EE. UU.): Hoechst 32258, Triton-X100, Tween 20, paraformaldehído (PFA), diaminobenzidina (DAB), Epoxi Embedding Medium kit. En Amersham-Pharmacia Biotech (UK) se adquirieron los siguientes productos: kit ECL Plus, membranas de polivinil difluoruro (PVDF), Ficoll-Paque Plus, marcadores de peso molecular de proteínas. α -modified Eagle's médium (α -MEM) fue adquirido en GIBCO (Grand Island, Nueva York, EE. UU.). El suero fetal bovino (SFB) es de Natocor (Córdoba, Argentina). Dentro de los anticuerpos utilizados, el anti-MBP fue cedido generosamente por el Dr. A. Campagnoni (Mental Retardation Research Center, UCLA) y el anti-P₀ por el Dr. O. Bizzozero (Universidad de Nuevo México, EE. UU.). El anti-PGP 9.5 es de Abcam Inc. (Cambridge, Massachusetts, EE. UU.). Todos los anticuerpos secundarios utilizados en inmunohistoquímica (IHQ) y Western Blot (WB) fueron adquiridos en Jackson (West Grove, Pensilvania, EE. UU.). El líquido de montaje para fluorescencia es de Dako North America Inc. (Carpinteria, California, EE. UU.). Todos los demás reactivos y solventes empleados en este trabajo fueron de grado analítico.

Animales: Se utilizaron ratas de la cepa Wistar criadas en el bioterio de la Cátedra de Química Biológica Patológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Buenos Aires), con un ciclo de luz-oscuridad cada 12 horas con acceso libre al agua y al alimento y temperatura de 24 °C en forma constante.

Compresión del nervio ciático: Ratas hembras adultas (70 días de edad, 270-300 g) fueron anestesiadas con ketamima (75 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) por vía intraperitoneal. El nervio ciático derecho fue expuesto a la altura del muslo medio y comprimido por 8 segundos utilizando pinzas de

relojero (Dumont n.º 5, Sigma Chem. Co). Una vez recuperados y a diferentes tiempos de sobrevida los animales fueron sacrificados para realizar los experimentos que se detallan a continuación. En todos los casos, se disecaron ambos nervios, identificándose en el nervio derecho (ipsilateral): la zona proximal (desde los ganglios dorsales ubicados en la médula espinal hasta el sitio de la lesión), la zona de la compresión (crush) y la zona distal (desde el sitio de la lesión hasta el extremo del nervio). En todos los casos los resultados fueron comparados con los obtenidos para el nervio izquierdo (contralateral), que actúa como control interno ya que no fue lesionado y/o con nervios provenientes de animales no operados (control).

Aislamiento de CMMO: Se utilizaron ratas macho adultas (300-400 g) de las cuales se extrajeron los huesos largos, se cortaron las epífisis para exponer la médula ósea, la cual fue extraída con 4 ml de α -MEM suplementado con 10 % SFB utilizando una jeringa con aguja. Los aspirados obtenidos fueron centrifugados a través de un gradiente de Ficoll-Paque plus (1,077 g/ml) durante 30 minutos a $1000 \times g$. El sobrenadante y la interfase fueron recolectados y centrifugados nuevamente durante 10 minutos a $1000 \times g$. El pellet obtenido representa las CMMO. Se obtuvieron alrededor de $15-20 \times 10^6$ células/animal.

Trasplante de las CMMO por vía sistémica: Ratas hembras sometidas a compresión del nervio ciático recibieron inmediatamente luego de la lesión una inyección intravascular a través de la arteria sacra media de 250 μ l de medio conteniendo 15×10^6 CMMO. Las ratas controles fueron inyectadas con solución fisiológica.

Preparación del tejido para IHQ: A 7 y 14 días de sobrevida, los animales fueron sacrificados y tanto el nervio ipsilateral como el contralateral fueron removidos y lavados con buffer fosfato salino (PBS) a 37°C , posteriormente fueron colocados en una solución fijadora (4 % PFA en PBS 1 \times , pH 7) durante toda la noche a 4°C . Posteriormente los tejidos fueron criopreservados sumergiéndolos secuencialmente en sacarosa 15 % y 30 % durante por lo menos 24 h a 4°C en cada solución. Una vez congelados fueron cortados en un criostato (Microm, Zeiss) a 16 μ m de espesor y montados en portaobjetos previamente gelatinizados. Posteriormente se lavaron con PBS y PBS- Tritón X-100 0,1 %. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con SFB 5 % en PBS durante 2 h a temperatura ambiente; posteriormente se realizó la incubación con los anticuerpos primarios

durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda: anti-P₀ (1/500, IgG de conejo), anti-MBP (1/400, IgG de conejo), anti-PGP 9.5 (1/200, IgG de conejo) todos diluidos en solución de bloqueo. Luego de varios lavados con PBS fueron incubados durante 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda con anticuerpos secundarios conjugados a Cy3 o Cy2. Conjuntamente se agregó Hoechst 32258 (2 µg/ml en PBS) para la tinción nuclear. Se realizaron controles incubando sin los anticuerpos primarios.

Los análisis se realizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX-100) y la cuantificación se realizó utilizando el programa Image Pro Plus. Se midió la integral de la densidad óptica (IOD) a las distintas sobrevidas y en las distintas áreas tomando 10 campos al azar por imagen; los valores fueron expresados en unidades arbitrarias y comparados con el nervio control en todas las situaciones experimentales.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE): Se sembraron 35 µg de proteínas por calle, las cuales fueron separadas en un SDS-PAGE al 16 %. Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con leche descremada al 5 % en Tris buffer salino con el agregado de 0,05 % Tween-20 (TBST) durante toda la noche a 4 °C. Las membranas fueron luego incubadas con anticuerpos primarios específicos: anti-MBP (1/1000, IgG de conejo), anti-P₀ (1/1000, IgG de conejo) y anti-PGP 9.5 (1/1000, IgG de conejo), diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Luego de varios lavados con TBST, las membranas fueron incubadas con anti-conejo conjugado a peroxidasa (1/10 000 o 1/2000 para revelado por método quimioluminiscente o colorimétrico, respectivamente). El revelado se realizó utilizando el kit de quimioluminiscencia ECL Plus y la visualización de las bandas se realizó utilizando un Storm 840 (Amersham Biosciences, Molecular Dynamics). Para el revelado colorimétrico se utilizó DAB. Las bandas fueron cuantificadas por densitometría con el Foto/Analyst Investigator-PC Foto/Eclipse conteniendo el programa Gel Pro Analyzer.

Microscopia óptica y electrónica: A 3, 7 y 14 días posteriores a la lesión, los animales fueron sacrificados y tanto el nervio ipsilateral como el contralateral fueron removidos y lavados con buffer fosfato 0,1 M (PB) pH 7,5 a 37 °C, posteriormente se los sumergió en un solución fijadora (4 % PFA, 2,5 % glutaraldehído (GA) en PB 0,1 M pH 7,5 frío (solución de Karnovsky)) durante toda la noche a 4 °C. A continuación fueron lavados

en sacarosa 0,32 M durante toda la noche. La posfijación se realizó en 1 % OsO_4 y ferrocianuro de potasio 1,25 % en buffer de fosfato de sodio 0,1 M durante 2 h. Se realizó una tinción en bloque con acetato de uranilo acuoso al 2 % durante toda la noche, seguido de un proceso de deshidratación en soluciones crecientes de etanol. Para la infiltración de los nervios se utilizó óxido de propileno: resina epoxi (Poly-Bed 812) (1:1), posteriormente fueron colocados durante 24 h en resina pura y finalmente se realizó la inclusión en cápsulas de gelatina y en moldes planos, orientando los nervios de manera tal de poder cortarlos transversalmente. La polimerización se realizó durante 72 h a 60 °C. Los cortes semifinos fueron colocados en portaobjetos y coloreados con azul de toluidina 0,5 % en carbonato de sodio 2,5 %. Los cortes finos fueron colocados en grillas de cobre de 300 mesh y coloreados con una solución de uranilo acuoso al 2 % durante 20 minutos y solución de Reynolds. Los cortes fueron analizados utilizando un microscopio electrónico Zeiss EM 109T. Las imágenes fueron fotografiadas con películas Kodac 5301, reveladas y escaneadas en un escáner Epson Perfection V500 Photo. Otras imágenes fueron obtenidas utilizando una cámara digital GAETAN.

Utilizando el programa Image Pro Plus se determinó el número de axones intactos por 100 μm^2 en 30 campos al azar en cada una de las áreas analizadas, el grosor de la línea mayor densa, del intraperiodo y de cada una de las capas de mielina. Así mismo se cuantificó el número de vueltas por 200 nm.

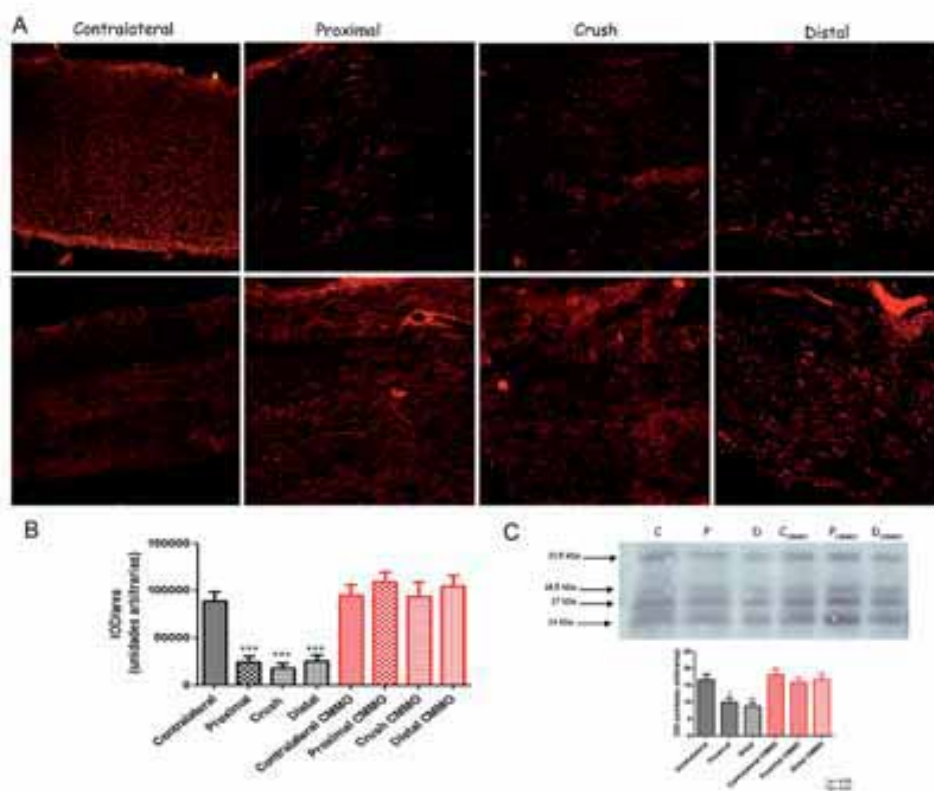
Análisis estadístico: El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de ANOVA seguido de un test de Dunnet o de Tukey. La significancia se determinó como $p < 0,05$.

Resultados

Para evaluar cuál es el efecto de las CMMO en el proceso de desmielinización-remielinización se analizó la distribución de las proteínas de mielina MBP y P_0 y de la proteína axonal PGP 9.5, a los 7 y 14 días de sobrevida, en animales que luego de la compresión del nervio ciático recibieron el trasplante de CMMO (grupo tratado) o la inyección de solución fisiológica (grupo no tratado). Al analizar la distribución de MBP, se observó en el grupo no tratado la pérdida en la continuidad de la marcación en la zona proximal, y una reorganización de las proteínas, en la

zona de la compresión y en la zona distal a la misma evidenciada por la aparición de acúmulos inmunorreactivos (IR) a MBP. En cambio, en los animales tratados se pudo ver una recuperación en la continuidad de la marcación a lo largo del nervio ipsilateral, aunque continúa la presencia de acúmulos en el segmento distal; esto último explicaría la mayor intensidad de fluorescencia observada, ya que se suma la fluorescencia asociada a los acúmulos con la asociada a la marcación más continua (figura 1A). La cuantificación de la IOD asociada a MBP mostró una recuperación a lo largo de todo el nervio ipsilateral, llegando a valores semejantes al nervio contralateral (figura 1B). Estos resultados fueron confirmados a través de WB (figura 1C).

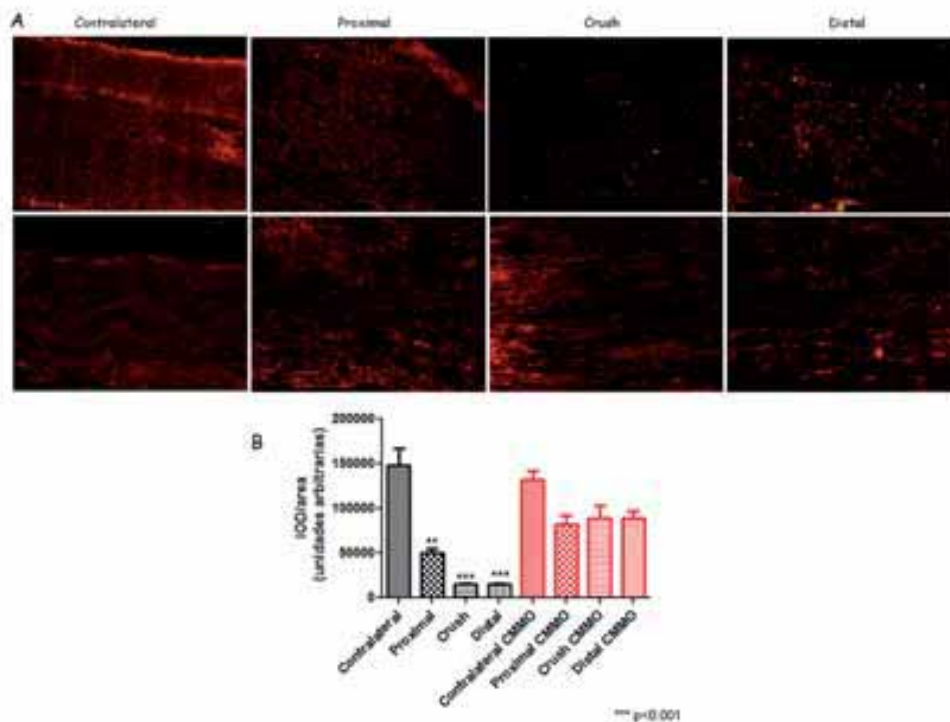
Figura 1. Distribución de MBP 7 días luego de la lesión (n = 5).



A: La línea superior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió una inyección de solución fisiológica luego de la compresión del nervio ciático. La línea inferior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió el trasplante de CMMO luego de la compresión del nervio ciático. B: Cuantificación de la IOD asociada a MBP para todas las áreas analizadas. C: WB para MBP. Cuantificación de la IOD para cada una de las áreas estudiadas. Todos los valores se expresan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Tukey; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

En cuanto al análisis a los 14 días de sobrevida, el mismo mostró que en los animales no tratados continúa la etapa de desmielinización, con menor presencia de acúmulos debido a la degradación de los mismos. En cambio, los animales tratados mostraron una menor cantidad de acúmulos y una mayor recuperación en la continuidad de la marcación (figura 2A). Esta mejora en la continuidad de la marcación en el nervio ipsilateral, se vio reflejada en el aumento de la IOD asociada a MBP, llegando a niveles similares al nervio contralateral (figura 2B).

Figura 2. Distribución de MBP 14 días luego de la lesión (n = 3).

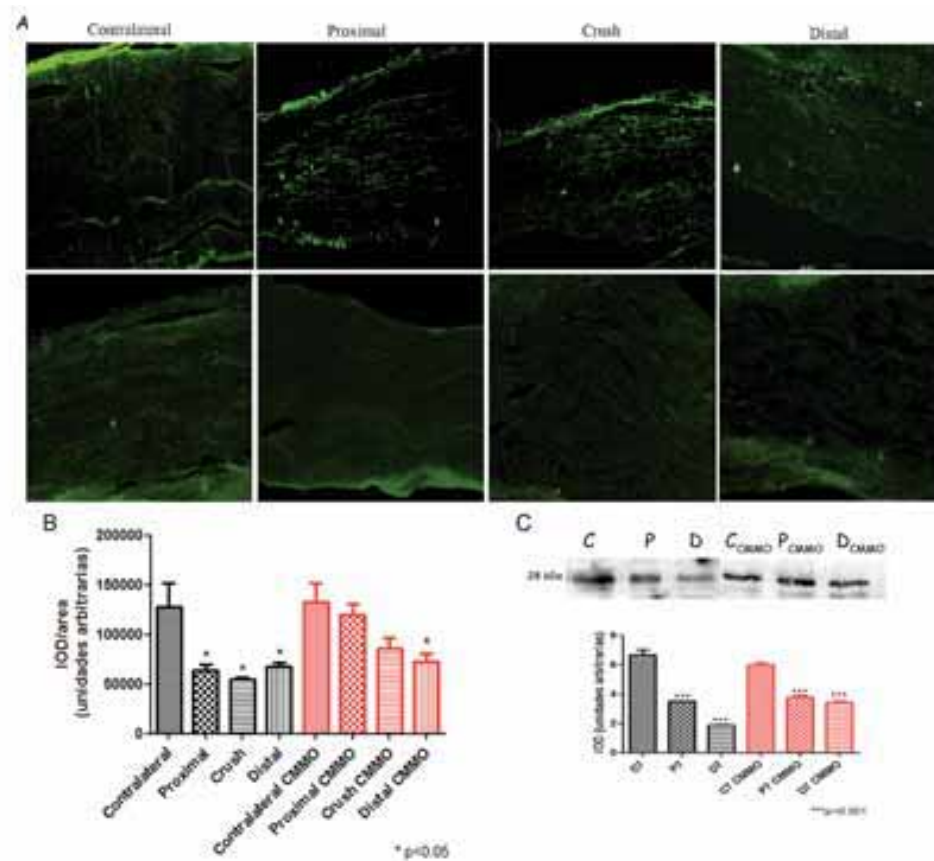


A: La línea superior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió una inyección de solución fisiológica luego de la compresión del nervio ciático. La línea inferior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió el trasplante de CMMO luego de la compresión del nervio ciático. B: Cuantificación de la IOD asociada a MBP para todas las áreas analizadas. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Tukey *** $p < 0,001$.

En relación con la distribución de P_0 , se observa a lo largo del nervio ipsilateral una pérdida en la continuidad de la marcación, aunque en mucha menor medida que la observada para el caso de MBP. Nuevamente aquí se ve el efecto benéfico de las CMMO trasplantadas, que permite una recuperación casi total del área proximal y del área de la compresión y una reducción significativa del número de acúmulos en el segmento distal

(figura 3A), con el consecuente aumento de la intensidad de fluorescencia asociada a este marcador (figura 3B). Los resultados fueron confirmados por WB (figura 3C).

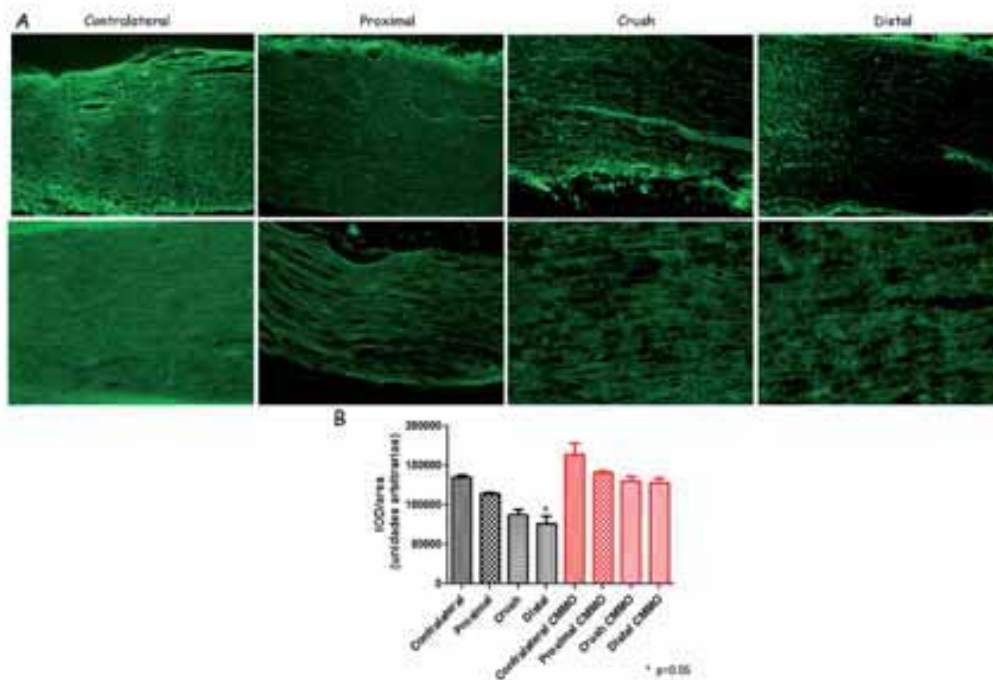
Figura 3. Distribución de P₀ 7 días luego de la lesión (n = 5).



A: La línea superior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió una inyección de solución fisiológica luego de la compresión del nervio ciático. La línea inferior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió el trasplante de CMMO luego de la compresión del nervio ciático. B: Cuantificación de la IOD asociada a P₀ para todas las áreas analizadas. C: WB para P₀, indicando el peso de la misma. Cuantificación de la IOD para cada una de las áreas estudiadas. Todos los valores se expresan como media ± SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Tukey; * p < 0,05 *** p < 0,001

Continuando con el análisis de P₀, a los 14 días, los animales no tratados mostraron el inicio de la recuperación espontánea, en comparación con lo observado a los 7 días de sobrevida (figura 3A, línea superior), mientras que los animales tratados con CMMO continúan presentando un nivel de esta proteína similar a un animal control (figura 4A) y significativamente diferente del presentado por los animales no tratados (figura 4 B).

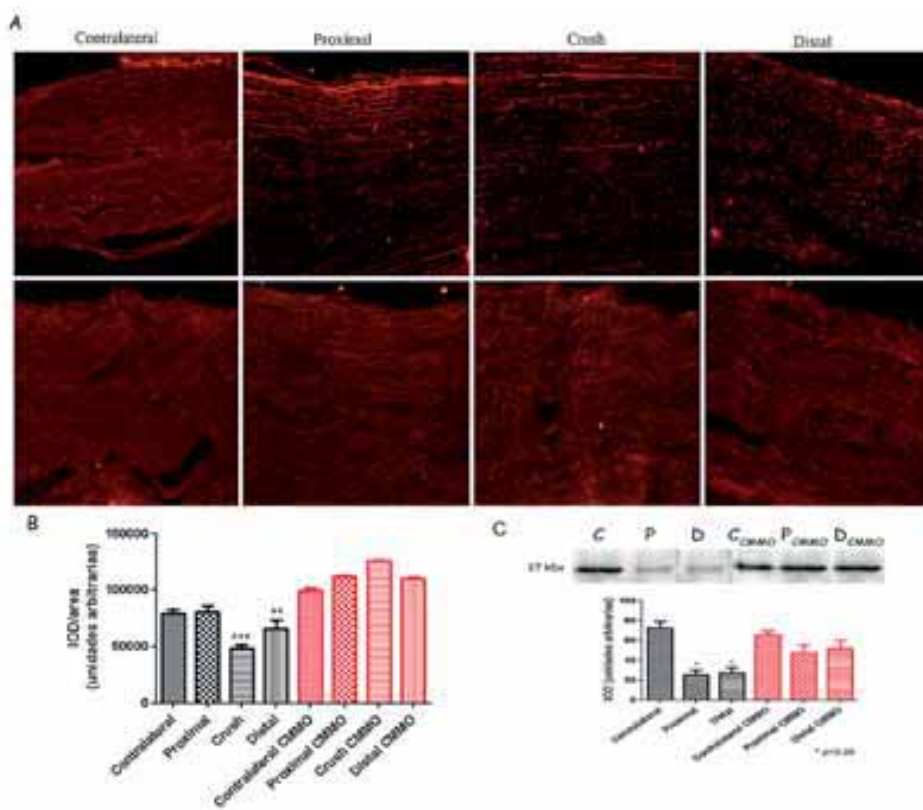
Figura 4. Distribución de P₀ 14 días luego de la lesión (n = 3).



A: La línea superior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió una inyección de solución fisiológica luego de la compresión del nervio ciático. La línea inferior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió el trasplante de CMMO luego de la compresión del nervio ciático. B: Cuantificación de la IOD asociada a P₀ para todas las áreas analizadas. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Tukey *** p < 0,001.

Por último, se evaluó la integridad de la fibra nerviosa, mediante IHQ para PGP 9.5; en el caso de los animales que recibieron la inyección de solución fisiológica se observó una pérdida en la continuidad axonal en el nervio ipsilateral y la aparición de acúmulos en el segmento distal. Por otra parte, los animales que recibieron el trasplante de las CMMO, mostraron una recuperación prácticamente total de la fibra nerviosa (figura 5A). Esto último se asocia con el hecho de que en el modelo experimental utilizado, el daño axonal es menor que el daño sufrido por la mielina (USACH et al., 2011). Estos datos fueron corroborados a través de WB (figura 5C).

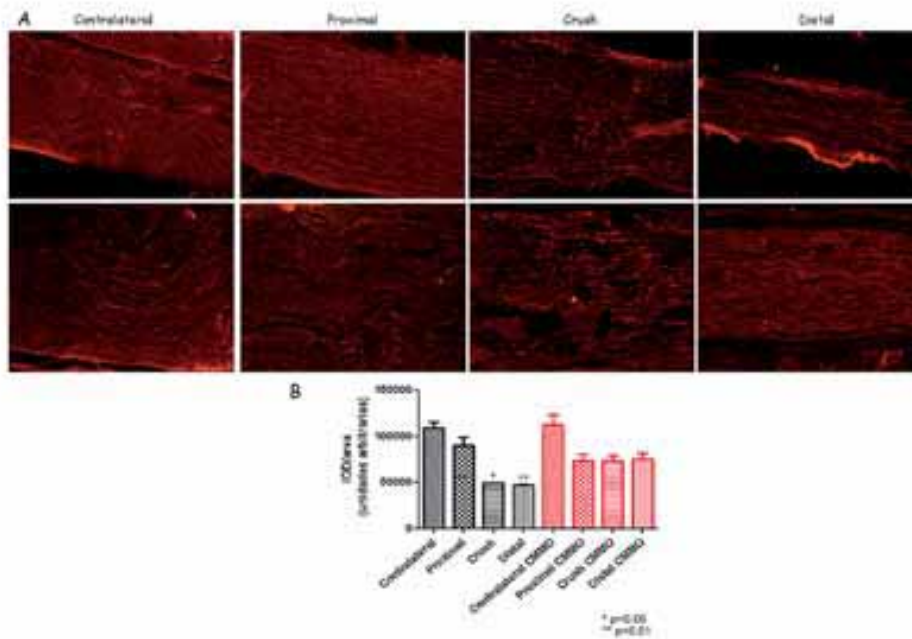
Figura 5. Distribución de PGP 9.5 7 días luego de la lesión (n = 5).



A: La línea superior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió una inyección de solución fisiológica luego de la compresión del nervio ciático. La línea inferior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió el trasplante de CMMO luego de la compresión del nervio ciático. B: Cuantificación de la IOD asociada a PGP 9.5 para todas las áreas analizadas. C: WB para PGP 9.5. Cuantificación de la IOD para cada una de las áreas estudiadas. Los resultados se expresan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Tukey; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Finalmente, el estudio de PGP 9.5 luego de 14 días, demostró una pérdida significativa en la continuidad de la marcación para esta proteína en la zona de la lesión y distal a la misma, pero no así en la zona proximal (figura 6A, línea superior); por otro lado, los animales del grupo tratado mostraron una recuperación en la continuidad de la fibra nerviosa, por lo que el nervio ipsilateral no resultó significativamente diferente del nervio contralateral (figura 6B).

Figura 6. Distribución de PGP 9.5 14 días luego de la lesión (n = 3).



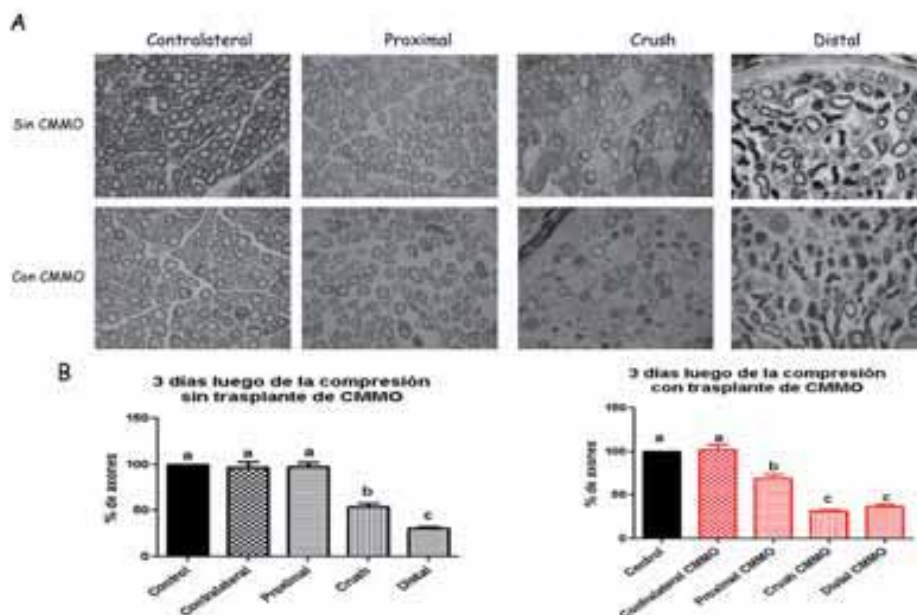
A: La línea superior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió una inyección de solución fisiológica luego de la compresión del nervio ciático. La línea inferior muestra el nervio contralateral y las diversas áreas del nervio ipsilateral en un animal que recibió el trasplante de CMMO luego de la compresión del nervio ciático. B: Cuantificación de la IOD asociada a PGP 9.5 para todas las áreas analizadas. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Tukey *** $p < 0,001$.

Habiendo demostrado el efecto de las CMMO sobre las proteínas mayoritarias de la mielina y de la fibra axonal, el siguiente paso fue evaluar tanto el número de axones intactos presentes como las características de los mismos. Para ello, se realizaron cortes semifinos que fueron analizados en un microscopio óptico y cortes finos que se analizaron en un microscopio electrónico para identificar las estructuras presentes en cada una de las situaciones estudiadas, así como las características de la vaina de mielina.

El análisis a los 3 días de sobrevida, mostró que en los animales del grupo no tratado, la zona proximal presentaba axones de estructura y tamaño conservados, muy similares al nervio contralateral. En cambio, en la zona de la compresión se observó una menor cantidad de axones (figura 7A, línea superior, y figura 7B), siendo los mismos de un tamaño menor, con una estructura más irregular. En la zona distal a la lesión, el número de axones disminuyó aún más, haciéndose más evidente la irregularidad en la morfología de los mismos (figura 7A, línea superior). En cuanto a los animales que recibieron el trasplante de CMMO, si bien el nervio contralateral no mostró

diferencias significativas con respecto al grupo anterior, en la zona proximal se observó una leve disminución en el contenido total de axones; mientras que en la zona de la compresión la caída en el número total de axones fue mucho más marcada (figura 7A, línea inferior, y figura 7B), evidenciándose una degeneración prácticamente total en dicha área. En cuanto al área distal, esta presenta un bajo número de axones, de pequeño tamaño y morfología irregular (figura 7A, línea inferior).

Figura 7. Análisis de nervios provenientes de animales que sufrieron la compresión del nervio ciático a los 3 días de sobrevida.

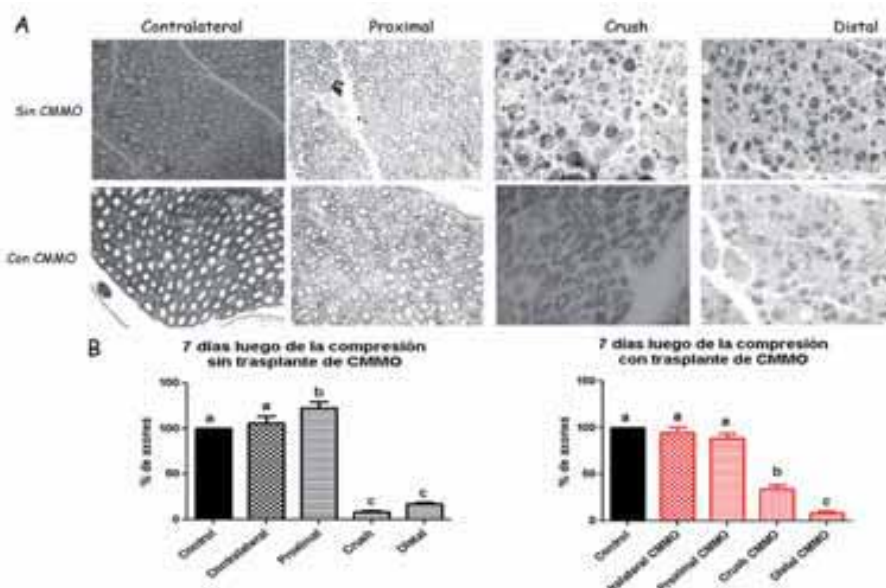


A: Cortes semifinos de animales que recibieron una inyección de solución fisiológica (línea superior) o trasplante de CMMO (línea inferior). B: Porcentajes de axones totales en cada una de las áreas analizadas para ambos grupos experimentales. Los resultados se expresan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Tukey, donde letras diferentes indican diferencias significativas entre ellas, $p < 0,001$.

Al analizar el grado de mielinización de los axones presentes en ambos grupos experimentales, se observó que tanto en el nervio contralateral como en el ipsilateral de los animales no tratados, el porcentaje de axones altamente mielinizados fue mayor con respecto a los escasamente mielinizados, dato previsible teniendo en cuenta que el nervio ciático es un nervio altamente mielinizado. En cambio, en los animales tratados se observó que en el nervio ipsilateral no había diferencias tan marcadas entre el porcentaje de axones altamente y escasamente mielinizados (datos no mostrados), mientras que en el nervio contralateral se conservó la relación característica de un nervio altamente mielinizado.

El análisis a los 7 días, mostró que en el grupo de animales no tratados, tanto el nervio contralateral como el área proximal a la lesión presentaban una apariencia normal. La zona de la compresión y distal a la misma, presentó una morfología típica de una DW, con grandes cantidades de restos de mielina y axones (figura 8A, línea superior). En el grupo de animales tratados se encontró que tanto el nervio contralateral como el área proximal a la lesión no presentaban diferencias significativas con respecto a un animal control. El área de la compresión presentó diferencias significativas tanto respecto a igual zona del grupo no trasplantado ($34,13 \pm 4,35$ vs. $8,33 \pm 1,41$ respectivamente) como respecto al control. Sin embargo, estos axones no presentaban una morfología similar a la de los axones controles (figura 8A, línea inferior). En el segmento distal no hubo diferencias significativas entre ambos grupos experimentales, pero si respecto a un animal control.

Figura 8. Análisis de nervios provenientes de animales que sufrieron la compresión del nervio ciático a los 7 días de sobrevida.

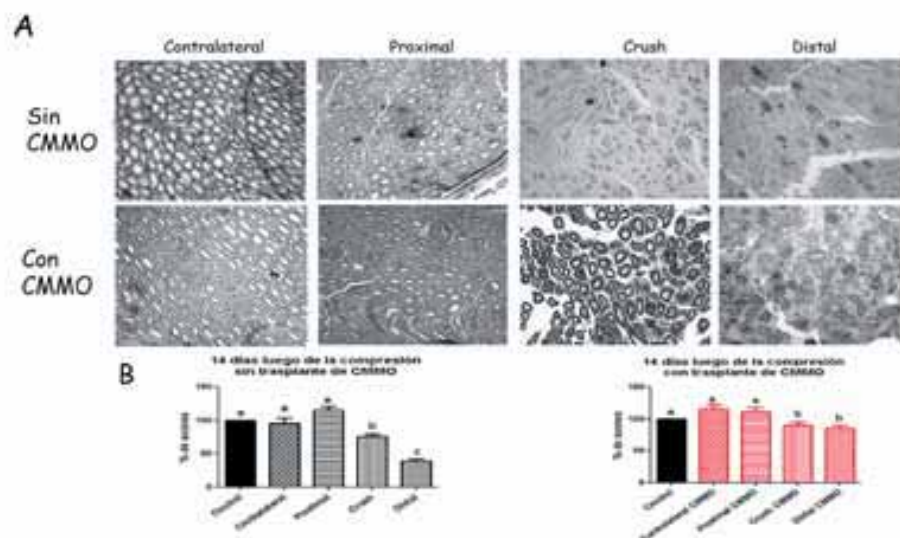


A: Cortes semifinos de animales que recibieron una inyección de solución fisiológica (línea superior) o trasplante de CMMO (línea inferior). B: Porcentajes de axones totales en cada una de las áreas analizadas para los animales en ambos grupos experimentales. Los resultados se expresan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó con un ANOVA, seguido de un test de Tukey, donde letras diferentes indican diferencias significativas entre ellas, $p > 0,001$

Teniendo en cuenta las características fisiológicas del nervio ciático, se observó que en ambos grupos experimentales, el nervio contralateral mantenía una relación similar al control con respecto a los axones altamente mielinizados y los escasamente mielinizados. Sin embargo, en el área proximal del grupo no tratado aumentó la proporción de axones escasamente mielinizados. Tanto en el área de la compresión como en la zona distal, los pocos axones intactos encontrados eran en su mayoría escasamente mielinizados. En el caso del grupo que recibió el trasplante de CMMO se encontró una tendencia a la recuperación, con una mayor cantidad de axones altamente mielinizados todo a lo largo del nervio ipsilateral, a pesar de lo cual en el área distal no se llega a recuperar la relación observada en el nervio control (datos no mostrados).

Al realizar estos estudios a los 14 días de sobrevida, se observó que en los animales que recibieron la inyección de solución salina el nervio contralateral y el segmento proximal no presentaban grandes cambios respecto a lo observado en un nervio control (figura 9A, línea superior). En la zona de la compresión aumentó el número de axones totales respecto a los encontrados a los 7 días ($75,81 \pm 3,97$ vs. $8,33 \pm 1,41$). Este mismo resultado se observó en la zona distal ($39,04 \pm 3,1$ vs. $17,34 \pm 1,75$). Esto indicaría el inicio de la remielinización espontánea que ocurre normalmente luego de una lesión de tipo reversible como es la compresión del nervio ciático. En cuanto a los animales del grupo tratado, el nervio contralateral y el segmento proximal tampoco mostraron diferencias significativas con respecto al nervio control (figura 9A, línea inferior). En cambio, en el área de la compresión se observó la presencia de un mayor número de axones con respecto a los animales no tratados a igual sobrevida ($90,41 \pm 4,97$ vs. $75,81 \pm 3,97$); esto mismo fue observado en el área distal a la compresión ($85,09 \pm 4,732$ vs. $39,04 \pm 3,108$) (figura 9B). Al comparar los animales trasplantados a los 7 y 14 días de sobrevida, también se encontraron diferencias significativas. El área de la compresión presentó un mayor número de axones a los 14 días de sobrevida ($90,41 \pm 34$ vs. $13 \pm 4,35$), al igual que la zona distal a la lesión ($85,09 \pm 4,732$ vs. $8,408 \pm 1,865$). En relación con las características de los axones encontrados, se pudo observar que en el área de la compresión, la mayoría correspondía a axones altamente mielinizados, con una morfología más semejante a la de un nervio control. En la zona distal los axones encontrados continuaron siendo en su mayoría escasamente mielinizados.

Figura 9. Análisis de nervios provenientes de animales que sufrieron la compresión del nervio ciático a los 14 días de sobrevida.

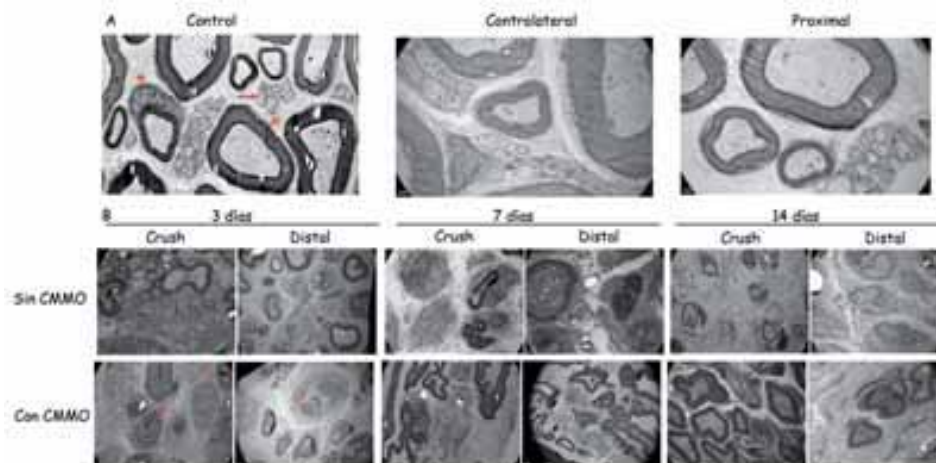


A: Cortes semifinos de animales que recibieron una inyección de solución fisiológica (línea superior) o trasplante de CMMO (línea inferior). B: Porcentaje de axones totales en cada una de las áreas analizadas para cada grupo experimental. Los resultados se expresan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Tukey, donde letras diferentes indican diferencias significativas.

En cuanto al análisis ultraestructural de los axones provenientes de las distintas áreas estudiadas, como era de esperar tanto el nervio control como los nervios contralaterales y la zona proximal de los nervios ipsilaterales de ambos grupos experimentales, en todas las sobrevidas estudiadas, presentaban en su mayoría axones mielinizados, con escaso número de axones no mielinizados formando los paquetes de Remark (figura 10A). Teniendo en cuenta estos datos, el análisis ultraestructural se centró en la zona de la lesión y en el área distal a la misma. Luego de 3 días de sobrevida, en ambos grupos experimentales, la zona de la compresión mostró evidencias de que el proceso de DW ya había comenzado, con menor cantidad de axones mielinizados y aparición de restos de mielina (figura 10B); un menor grado de desmielinización pudo encontrarse en la zona distal del grupo no tratado respecto al grupo tratado. Cabe aclarar que en la figura 10B, tanto en la zona de la compresión como en la zona distal a la misma, a los 3 días de sobrevida fue posible identificar células cuya morfología no coincide con la morfología de las CS, de fibroblastos o macrófagos, por lo tanto, se podría pensar que se trata de las CMMO trasplantadas que han llegado al nervio lesionado.

Luego de 7 días de sobrevida, el nervio ipsilateral del grupo no tratado, mostró que el proceso de DW aún persistía, con ausencia de axones mielinizados, presencia de mucho tejido conectivo y estructuras que contenían tanto mielina como axones degradados; continuando el estudio de los nervios provenientes de este grupo, a los 14 días tras la lesión, si bien el panorama encontrado fue bastante similar, se evidenció la presencia de algunos axones mielinizados, lo que demuestra la reversibilidad espontánea del modelo (figura 10B). A estas dos últimas sobrevidas analizadas (7 y 14 días), el grosor de la mielina en ambas áreas fue significativamente menor respecto a nervios controles, a los nervios contralaterales y proximales (figura 10A). En contraposición a lo observado en el grupo no tratado, el grupo que recibió el trasplante de CMMO mostró una mejora notable en la zona de la compresión y distal a la misma luego de 7 días de sobrevida; en este caso, si bien se encontraron axones mielinizados, la morfología de los mismos no es la que se observa habitualmente en un nervio sano (figura 10B). Al continuar con el análisis, luego de los 14 días, se observó una morfología más conservada en los axones mielinizados de la zona de la compresión, mientras que en la zona distal a la misma, la mejora no fue tan evidente. El análisis del ancho de la mielina de todos los segmentos analizados, resultó ser significativamente menor que el nervio control, sin embargo, hubo una tendencia a la recuperación, dado que en todos los casos, el grupo tratado con CMMO mostró una vaina de mielina de mayor grosor que los animales no tratados (tabla 1).

Figura 10. Análisis ultraestructural del nervio ciático lesionado.



A: Imágenes de microscopía electrónica de un nervio control, un nervio contralateral y el segmento proximal del nervio ipsilateral; B: Imágenes de microscopía electrónica del segmento de la compresión (crush) y del área distal a la misma a los 3, 7 y 14 días de sobrevida de nervios provenientes de animales que sufrieron la compresión del nervio ciático y que junto con la misma recibieron una inyección de solución fisiológica o el trasplante de CMMO. La flecha señala un paquete de Remark (CS no mielinizantes), el asterisco señala una CS; el numeral señala un axón altamente mielinizado y el signo de interrogación señala posibles CMMO trasplantadas.

Tabla 1: Análisis ultraestructural del nervio ciático lesionado

	Ancho mielina (μm)								
	Control	Contralateral	Proximal	Crush 3d	Distal 3d	Crush 7d	Distal 7d	Crush 14d	Distal 14d
Sin CMMO	1,24 \pm 0,07	1,15 \pm 0,08	1,11 \pm 0,06	0,60 \pm 0,05*	0,89 \pm 0,08	0,48 \pm 0,05***	0,27 \pm 0,06***	0,24 \pm 0,03***	0,17 \pm 0,04***
Con CMMO		1,20 \pm 0,08	1,08 \pm 0,07	0,68 \pm 0,05*	0,58 \pm 0,05***	0,73 \pm 0,09**	0,60 \pm 0,03**	0,74 \pm 0,10**	0,57 \pm 0,05**

Cuantificación del ancho de la vaina de mielina en las diferentes áreas estudiadas para ambos grupos experimentales. Los valores se expresan como media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA seguido de un test de Tukey.

Posteriormente se analizaron las características de la vaina de mielina mediante distintas mediciones: el ancho de la línea mayor densa y el ancho del interperiodo para cada una de las áreas de interés. En esas mismas situaciones también se midió el número de vueltas de mielina presentes en 100 nm de nervio (datos no mostrados). Al analizar el ancho de la línea mayor densa se observó que no presenta diferencias significativas entre los diferentes grupos analizados. En cuanto al ancho del intraperiodo parecería haber una tendencia a la disminución a medida que aumenta la desmielinización en el grupo no trasplantado. Sin embargo, en el grupo que recibió el trasplante de CMMO solo se evidenció un aumento significativo en el ancho del

intraperiodo a los 3 días (momento de mayor desmielinización), mientras que el resto de las sobrevidas analizadas no mostró cambios significativos respecto a un nervio control. A pesar de estas diferencias, la cantidad de vueltas de mielina (línea mayor densa + intraperiodo) en 100 nm no presentó diferencias significativas. Estos resultados junto con los presentados en la tabla 1 sugerirían que la desmielinización provoca una pérdida de capas de mielina en los axones, sin alterar el grosor de las líneas principales de dicha mielina.

Discusión

Las neuropatías periféricas, congénitas o adquiridas, tienen una prevalencia muy elevada dentro de la población mundial, de ahí la importancia de profundizar en los mecanismos que permitan una remielinización eficiente para disminuir sus efectos invalidantes y la evolución clínica poco satisfactoria que suelen tener estas neuropatías (DEZAWA et al. 2001, CUEVAS et al., 2004). Aún son limitadas las aproximaciones terapéuticas para estos desórdenes neurológicos. Hace pocos años la investigación en células madre ha explotado como una herramienta para desarrollar potenciales terapias para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas incurables. Pese a los resultados prometedores, existen restricciones éticas que dificultan el uso de algunos tipos celulares para el trasplante en humanos. Es importante tener en cuenta que una vez producida la lesión hay un aumento en la permeabilidad de la barrera hemato-nerviosa que permitiría la llegada de factores y células presentes en circulación que facilitarían la reparación del tejido lesionado. Entre dichas células se encuentran las CMMO, cuya migración espontánea (SETTON-AVRUJ et al., 2007; USACH et al., 2011) podría representar un mecanismo de reparación endógeno frente a un proceso de desmielinización-remielinización.

Las actuales estrategias de remielinización del SNP incluyen terapias celulares que utilizan el trasplante de células formadoras de mielina, como son las CS, diversos tipos de células madre como tales o diferenciadas in vitro a CS, o tratamiento con factores tróficos o moléculas que estimulen la remielinización. Varios experimentos han demostrado que el trasplante de CS favorece la remielinización y mejora la conducción nerviosa (DEZAWA et al., 2001; CUEVAS et al., 2004; MIMURA et al., 2004; FELTRI et al.,

1992; HONMOU et al., 1996; TOHILL; TERENGHI, 2004). A pesar de esto, es inapropiado desde un punto de vista práctico, considerando la dificultad para obtener un número suficiente de células. Los trasplantes autólogos requerirían el cultivo de células obtenidas a partir del sacrificio de un nervio sano y sería necesario mantenerlas en cultivo un tiempo prolongado hasta obtener el número suficiente para un posterior trasplante. Por estos motivos, lo ideal sería la obtención de células «mielinizantes» a partir de otras fuentes distintas del SNP; estas células deberían ser de fácil obtención y expansión, y tener la capacidad de sobrevivir e integrarse rápidamente en el tejido del organismo receptor.

Actualmente, muchos grupos en el mundo están trabajando con el objeto de encontrar un tipo celular que pueda cumplir con estos requisitos. Cualquiera sea el tipo celular elegido, el destino que las mismas tendrán luego de ser trasplantadas in vivo, dependerá del entorno en el cual son inyectadas. Walsh et al. (WALSH et al., 2012) han demostrado que el ambiente tiene un efecto significativo sobre la tasa de supervivencia de las células trasplantadas. Dentro de los tipos celulares más utilizados con el fin de estimular la regeneración nerviosa se destacan las CMMO (ver más adelante), las CEMO (AKIYAMA et al., 2002a; AKIYAMA et al., 2002b; DEZAWA et al., 2001; CUEVAS et al., 2004; MIMURA et al., 2004 ; TOHILL; TERENGHI, 2004; CHOPP et al., 2000; SHII et al., 2001; SYKOVA et al., 2006a; SYKOVA et al., 2006b; LADAK et al., 2011), las células olfatorias envolventes (OEC) (GUEROUT et al., 2011a, GUEROUT et al., 2011; SASAKI et al., 2011), los precursores endoteliales (CHEN et al., 2012; KIRTON et al., 2010), las células madre derivadas de adipocitos (GU et al., 2012; LIU et al., 2012), células madre derivadas de pulpa dentaria (SAKAI et al., 2012) y células madre derivadas de piel (WALSH et al., 2012).

A pesar de los resultados hallados con los tipos celulares antes mencionados, en los últimos años muchos grupos se han enfocado en el estudio de las CMMO como fuente de células que permitan la regeneración de diversos tipos de daños. Estas células, una vez trasplantadas en los extremos del nervio transectado, facilitan la formación de mielina y la regeneración axonal (GOEL et al., 2009), así como también la regeneración del nervio ciático luego de una cirugía que una los extremos de un nervio lesionado (LOPES-FILHO et al., 2010). Los mecanismos propuestos para explicar la acción regenerativa de estas células incluyen su capacidad para ejercer un efecto

neurotrófico (RIBEIRO-RESENDE et al., 2009) y la estimulación de la angiogénesis (FERNANDES et al., 2008), permitiendo tanto la regeneración de neuronas como de glia en nervios periféricos dañados (RIBEIRO-RESENDE et al., 2009). Las CMMO han demostrado ser capaces de rescatar a las motoneuronas afectadas en un modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica (BLANQUER et al., 2010). Así mismo, ha sido ampliamente estudiado su efecto en diversos modelos de daño a la médula espinal (KUMAR et al., 2009; SAMDANI et al., 2009). También mostraron ser efectivas en la regeneración axonal que ocurre luego del trasplante en un modelo de daño al ganglio de la retina (ZAVERUCHA-DO-VALLE et al., 2011), así como luego de accidentes cerebrovasculares y traumas (CHOPP; LI, 2002). Con base en todos los conocimientos adquiridos, ya se están realizando algunos estudios preclínicos (SYKOVA et al., 2006a; SYKOVA et al., 2006b; FRIEDRICH et al., 2012; VASCONCELOS-DOS-SANTOS et al., 2012).

Con base en estos resultados tan alentadores decidimos utilizar esta fracción altamente plástica en nuestro modelo. Dado que el fin último es aportar los conocimientos necesarios para que las técnicas de trasplante celular puedan ser aplicadas en seres humanos, priorizamos un tipo celular que permita el trasplante autólogo, que se obtenga por métodos poco invasivos, que estén disponibles en un corto plazo luego de su obtención, dado que existe una corta ventana temporal para que el trasplante celular se traduzca en resultados beneficiosos para el paciente. De esta manera, aquellas células que no requieran ser mantenidas en cultivo para su expansión y/o diferenciación serían las candidatas ideales, sumando a esto el hecho de que se evitarían los cambios de fenotipo (AUGELLO et al., 2010) así como las posibles contaminaciones relacionadas con el mantenimiento de las células en cultivo (LeBLANC et al., 2004; SUNDIN et al., 2007).

Los resultados obtenidos luego de 7 días de producida la lesión en los animales que recibieron el trasplante de CMMO (figuras 1, 3, 5, 8) muestran una clara disminución de la desmielinización y una mejora en la continuidad de la fibra nerviosa, que se hace más evidente a los 14 días posteriores al trasplante (figuras 2, 4, 6, 9). Realizando el análisis a sobrevividas más tempranas pudimos observar que las CMMO parecerían acelerar el proceso de degeneración para luego, y como consecuencia de la mayor velocidad en la remoción de los restos de mielina y axones degenerados, acelerar el proceso de regeneración (figura 7). Esto confirmaría uno de los

principios fundamentales de la remielinización, que plantea que la eliminación de los restos de mielina es un paso imprescindible para la remielinización.

Es difícil explicar la remielinización inducida por las CMMO trasplantadas solo a partir del fenómeno de transdiferenciación (USACH et al., 2011; DEZAWA et al., 2000; DUBOVY, 2004; EDGAR; GARBERN, 2004), por lo que se propone que otros mecanismos además de la transdiferenciación/fusión a CS estarían involucrados. Entre ellos podemos destacar la estimulación de mecanismos de reparación endógena, es decir, la migración espontánea de células endógenas, y aquellos relacionados con la función neuroinmunomoduladora ejercida por las CMMO (BARNABE et al., 2009; BLISS et al., 2007; HESS; BORLONGAN, 2008; MENDEZ-OTERO et al., 2007). Datos bibliográficos describen que las CEMO, una de las poblaciones celulares que integran la fracción de las CMMO, ejercen un efecto inmunomodulador a través de la secreción de diversos factores solubles sobre células del sistema inmune (NEWMAN et al., 2009).

Hasta el momento los beneficios de las CMMO para las terapias de trasplante parecerían ser dobles. Primero, su efecto trófico transitorio puede retrasar la muerte celular en el área afectada (CHOPP; LI, 2002; CHOPP et al., 2000; BORLONGAN et al., 2004; HOFSTETTER et al., 2002; MUÑOZ et al., 2005) y, segundo, la pluripotencia de las CMMO da origen a diversos tipos celulares que pueden ser utilizados en la terapia celular. Los conocimientos actuales sobre la naturaleza de las señales liberadas desde el sitio de la lesión que estimulan la movilización de las CMMO fuera de la médula ósea aún son muy limitados. Una hipótesis sería que las citoquinas y/o las quemoquinas que se sobreexpresan frente al daño producido son liberadas a la circulación desde tejidos remotos, promoviendo la disminución de la expresión de las moléculas de adhesión que retienen a las CMMO en su nicho (LIU et al., 2001).

A pesar de que en la bibliografía está ampliamente descrito el efecto regenerativo que poseen las células madre luego de ser trasplantadas en el sitio de la lesión, nuestros resultados van aún más allá. Conjugando los resultados descritos en el presente trabajo con nuestros resultados previamente publicados (SETTON-AVRUJ et al., 2007; USACH et al., 2011), que demuestran la migración espontánea o postrasplante de las CMMO exclusivamente al nervio ipsilateral, podemos sugerir que existe un mecanismo intrínseco de reparación del SNP mediado por las CMMO.

Por otro lado, a diferencia de otros protocolos experimentales, nuestra propuesta tiene la ventaja de utilizar un método poco invasivo, como es la inyección por vía sistémica, que sería de realización sencilla, sin depender de quirófanos o áreas especializadas y estériles para los tratamientos; además, esta vía de administración ha demostrado tener menos efectos adversos que los evidenciados luego de una administración a través de la carótida o la inyección directa en el tejido lesionado. Los resultados presentados en este trabajo nos permiten proponer que la capacidad de remielinización ejercida por las CMMO podría ser promovida ya sea mediante la estimulación de la migración de CMMO endógenas o mediante la realización de trasplantes autólogos, mediante el cual evitaríamos la posibilidad de rechazo, riesgo inherente a todos los trasplantes convencionales. Una de las principales ventajas de este tipo de terapia celular es que permitiría el tratamiento de múltiples órganos y lograr efectos a largo plazo, ejerciendo diversas acciones dependiendo del momento de realización del trasplante, ya que las células tienen la capacidad de anidar en diferentes regiones según el microambiente al cual se vean expuestas.

De demostrarse nuestra hipótesis que considera que la migración espontánea de CMMO hacia la zona distal de un nervio sometido a DW podría representar un mecanismo de defensa del sistema nervioso frente a un daño, estaremos en presencia de una herramienta que permitirá idear terapias que estimulen la remielinización por diversos caminos: a) estimulando la migración de las CMMO endógenas mediante la utilización de agonistas que activen las señales biológicas involucradas en la migración, promoviendo así los mecanismos de reparación intrínsecos del organismo; b) proveyendo de una fuente exógena de células mielinizantes autólogas, que puedan ser obtenidas en cantidades suficientes para que su uso en la clínica sea una posibilidad real. Más allá de cuál sea la fuente primaria de células pluripotentes, estaremos ante la posibilidad de que en el futuro se pueda pensar en terapias celulares que permitan la obtención de células específicas del tejido sin la necesidad de realizar trasplantes de órganos completos, ya que los daños tisulares crearían el ambiente favorable para el cruce de barreras específicas del linaje.

A pesar de los grandes avances que se han hecho en los últimos tiempos y los efectos beneficiosos del trasplante de CMMO, demostrados en este trabajo, entre otros, muchos interrogantes quedan aún sin resolver. Por ejemplo, dónde y cuándo implantar las células, asegurarse que el pasaje

de las células por la jeringa no cause su daño, así como asegurarse de tener una suspensión de células disociadas previa al trasplante. Otro punto importante es saber cómo las células reconocen al tejido dañado y cómo ejercen sus efectos beneficiosos. Cabe preguntarse si cualquier tipo de daño que esté acompañado por un proceso inflamatorio, como sucede en los procesos neurodegenerativos, guiaría a las CMMO hacia dicho sitio.

Conclusiones

Al comparar ambos grupos experimentales utilizados en el presente trabajo, se evidencia que las CMMO aceleran la remielinización del nervio ipsilateral, la cual puede ser evidenciada a partir de los 7 días poslesión y que se vuelve más evidente luego de 14 días. Esta recuperación se debe a que por un lado se acelera el proceso de degeneración, de manera tal que a los 3 días el grupo tratado muestra un claro avance del proceso de DW, con un menor número de axones en el área de la compresión y distal a la misma y con una proporción mayor de axones escasamente mielinizados en dichas áreas. Ya a los 7 días la situación se modificó, de manera que el grupo no tratado presenta una morfología típica de una DW, mientras que el grupo que recibe el tratamiento con CMMO presenta una recuperación en la cantidad total de axones así como un mayor porcentaje de axones mielinizados en la zona de la compresión. A los 14 días de sobrevida, en el grupo no tratado se manifiestan los primeros indicios de la regeneración espontánea, mientras que el grupo tratado con CMMO se encuentra en franco proceso de regeneración.

Si bien aún quedan muchos interrogantes por contestar, estaríamos en presencia de un mecanismo de reparación endógeno del organismo frente a diversos tipos de daños, el cual podría ser estimulado mediante la movilización de las CMMO endógenas una vez que se conozcan las señales que provocan la migración, o mediante el trasplante de CMMO por vía sistémica, o por una combinación de ambos métodos.

Cabe destacar que se necesita otra serie de experimentos para establecer las señales biológicas involucradas en la migración de las células exclusivamente hacia los tejidos lesionados. El conocimiento de estos mecanismos permitirá desarrollar estrategias terapéuticas que induzcan ya sea la migración de las células endógenas o de las células trasplantadas de manera autóloga, con el fin de estimular la remielinización frente a procesos de desmielinización asociados a neuropatías congénitas o adquiridas.

Bibliografía

AKIYAMA, Y. et al. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J Neurosci*, v. 22, n. 15, p. 6623-6630, 2002a. Disponible en: <<http://www.jneurosci.org/content/22/15/6623.full.pdf>>.

AKIYAMA, Y. et al. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia*, n. 39, p. 229-236, 2002b.

ALISON, M. R. et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, n. 406, p. 257, 2000a.

AUGELLO, A. et al. MSCs: from cultures to niches. *European Cells and Materials*, v. 20, p. 121-133, 2010.

BARNABE et al. Chemically-Induced RAT Mesenchymal Stem Cells Adopt Molecular Properties of Neuronal-Like Cells but Do Not Have Basic Neuronal Functional Properties. *PLoS ONE*, v. 4, n. 4, e5222, 2009. Disponible en: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0005222>>.

BLANQUER, M. et al. Bone marrow stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: technical aspects and preliminary results from a clinical trial. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, n. 32, p. 31-37, 2010.

BLISS, T. et al. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke*, n. 38, p. 817-826, 2007.

BORLONGAN, C. V. et al. Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. *Brain Res Jun* 1010: 108-16, 2004

CHEN, C-H. et al. Human Blood-Vessel-Derived Stem Cells for Tissue Repair and Regeneration. *J Biomed Biothchnol*, n. 597439, 2012. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3303622/>>.

CHOPP, M.; LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurology*, n. 1, p. 92-99, 2002.

CHOPP, M. et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*, n. 11, p. 3001-3005, 2000.

CRAIN, B. J.; TRAN, S. D.; MEZEY, E. Transplanted human bone marrow cells generate new brain cells. *J Neurol Sci*, n. 233, p. 121-123, 2005.

CUEVAS, P. et al. Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. *Neurol Res*, n. 26, p. 230-232, 2004.

DEZAWA, M. et al. Role of Schwann cells in retinal ganglion cell axon regeneration. *Prog Retin Eye Res*, n. 19, p. 171-204, 2000.

DEZAWA, M. et al. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bonemarrow stromal cells. *Eur J Neurosci*, n. 14, p. 1771-1776, 2001.

DUBOVY, P. Schwann cells and endoneurial extracellular matrix molecules as potential cues for sorting regenerated axons: a review. *Anat Sci Int*, n. 79, p. 198-208, 2004.

EDGAR, J. M.; GARBERN, J. The myelinated axon is dependent on the myelinating cell for support and maintenance: molecules involved. *J Neurosci Res*, n. 76, p. 593-598, 2004.

FELTRI, M. L. et al. Mitogen-expanded Schwann cells retain the capacity to myelinate regenerating axons after transplantation into rat sciatic nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, n. 89, p. 8827-8831, 1992.

FERNANDES, M. et al. Bone marrow cells are able to increase vessels number during repair of sciatic nerve lesion. *J Neurosci Methods*, v. 170, n. 1, p. 16-24, 2008.

FERNÁNDEZ, E. et al. Neurosurgery of the peripheral nervous system: Injuries, degeneration, and regeneration of the peripheral nerves. *Surg Neurol*, n. 48, p. 446-447, 1997.

FLORES, C. J. et al. Anatomy and physiology of peripheral nerve injury and repair. *Am J Orthop*, n. 29, p. 167-173, 2000.

FRIEDRICH, M. A. et al. Intra-arterial infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with moderate to severe middle cerebral artery acute ischemic stroke. *Cell Transplant*, n. 21, suppl. 1, p. 13-21, 2012.

GIRALDI-GUIMARAES, A. et al. Treatment with bone marrow mononuclear cells induces functional recovery and decreases neurodegeneration after sensorimotor cortical ischemia in rats. *Brain Res*, n. 1266, p. 108-120, 2009.

GOEL, R. K. et al. Effect of bone marrow-derived mononuclear cells on nerve regeneration in the transection model of the rat sciatic nerve. *J Clin Neurosci*, n. 16, p. 1211-1217, 2009.

GU, J. H. et al. Transplantation of adipose derived stem cells for peripheral nerve regeneration in sciatic nerve defects of the rat. *Curr Stem Cell Res Ther*, v. 7, n. 5, p. 347-55, Sep. 2012. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22563658>>.

GUEROUT, N. et al. Co-Transplantation of Olfactory Ensheathing Cells from Mucosa and Bulb Origin Enhances Functional Recovery after Peripheral Nerve Lesion. PLoS ONE, v. 6, n. 8, e22816, 2011b. doi:10.1371/journal.pone.0022816, 2011b. Disponible en: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0022816>>.

GUEROUT, N. et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration and functional recovery of peripheral nerve lesion in rats. Muscle Nerve, n. 43, p. 543-551, 2011a.

HESS, D. C.; BORLONGAN, C. V. Cell-based therapy in ischemic stroke. Expert Rev Neurother, n. 8, p.1193–1201, 2008. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18671663>>.

HOFSTETTER, C. P. et al. Marrow stromal cells for, guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. Proc Natl Acad Sci U S A, n. 99, p. 2199-204, 2002.

HONMOU, O. et al. Restoration of normal conduction properties in the adult rat by transplantation of exogenous Schwann cells. J Neurosci, n. 16, p. 3199-3208, 1996.

ISHII, K. et al. Increase of oligodendrocyte progenitor cells after spinal cord injury. J Neurosci Res, n. 65, p. 500-507, 2001.

KAWAMOTO, A; LOSORDO, D.W. Endothelial progenitor cells for cardiovascular regeneration. Trends Cardiovasc Med v. 18, n. 1, p. 33-37, 2008.

KIRTON, J. P. et al. Endothelial precursors in vascular repair. Microvasc Res, n. 79, p. 193-199, 2010.

KRAUSE, D. S. et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell , n. 105, p. 369-377, 2001.

KUMAR, A. A. et al. Autologous bone marrow derived mononuclear cell therapy for spinal cord injury patients: a phase I/II clinical safety and primary efficacy data. Exp Clin Transplant, n. 7, p. 241-248, 2009.

LADAK, A. et al. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. Exp Neurol, v. 228, n. 2, p. 242-252, 2011.

LeBLANC, K. et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet v. 363, n. 9419, p. 1439-1441, 2004.

- LIU, B. S. et al. Regenerative effect of adipose tissue-derived stem cells transplantation using nerve conduit therapy on sciatic nerve injury in rats. *J tissue Eng Regen Med*, 2 May 2012. Disponible en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22552954>>.
- LIU, Z. J. et al. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, n. 106, p. 984-991, 2009.
- LOPES-FILHO, J. D. et al. Microscopic evidences that bone marrow mononuclear cell treatment improves sciatic nerve regeneration after neurorrhaphy. *Microsc Res Tech*, n. 74, p. 355-363, 2010.
- MENDEZ-OTERO, R. et al. Potential roles of bone marrow stem cells in stroke therapy. *Regen Med*, n. 2, p. 417-423, 2007.
- MIMURA, T. et al. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg*, n. 101, p. 806-812, 2004.
- MUÑOZ, J. R. et al. Human steprogenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, n. 102, p. 18171-18176, 2005. Article corrected in: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1413669/>>.
- NAKANO-DOI, A. et al. Bone Marrow mononuclear cells promote proliferation of endogenous neural stem cells through vascular niches after cerebral infarction. *Stem Cells*, n. 28, p. 1292-1302, 2010.
- NEWMAN, R. E. et al. Treatment of Inflammatory Diseases with Mesenchymal Stem Cells. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, n. 8, p. 110-123, 2009.
- ORKIN, S. H.. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*, n. 1, p. 57-64, 2000.
- ORLIC, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, n. 410, p. 701-705, 2001.
- PETERSEN, B. E. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. n. 284, p. 1168-1170, 1999.
- PIMENTEL-COELHO, P. M.; MENDEZ-OTERO, R. Cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Stem Cells Dev*, n. 19, p. 299-310, 2010.

PIMENTEL-COELHO, P. M. et al. Human Cord Blood Transplantation in a Neonatal Rat Model of Hypoxic–Ischemic Brain Damage: Functional Outcome Related to Neuroprotection in the Striatum. *Stem Cells Dev*, n. 19, p. 351-358, Mar. 2010.

RIBEIRO-RESENDE, V. T. et al. Trophic activity derived from bone marrow mononuclear cells increases peripheral nerve regeneration by acting on both neuronal and glial cell populations. *Neuroscience*, n. 159, p. 540-549, 2009.

SAMDANI, A. F. et al. Transplantation of human marrow stromal cells and mono-nuclear bone marrow cells into the injured spinal cord. *Spine*, n. 34, p. 2605-2612, 2009.

SAKAI, K. et al. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest*, n. 122, p. 80-90, 2012.

SASAKI, M. et al. Remyelination after olfactory ensheathing cell transplantation into diverse demyelinating environments. *Exp Neurol*, n. 229, p. 88-98, 2011.

SETTON-AVRUIJ, C. P. et al. Presence of alpha-globin mRNA and migration of bone marrow cells after sciatic nerve injury suggests their participation in the degeneration/regeneration process. *Exp Neurol*, n. 203, p. 568-578, 2007.

SHYU, W. C. et al. Homing genes, cell therapy and stroke. *Front Biosci*, n. 11, p. 899-907, 2006.

SUNDIN, M. et al. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*, v. 92, n. 9, p. 1208-1215, 2007.

SYKOVA, E. et al. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *M Cell Transplant*, n. 15, p. 675-87, 2006a.

SYKOVA, E. et al. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels – two strategies for spinal cord injury repair. *Cell Mol Neurobiol*, n. 26, p. 1113-1129, 2006b.

THEISE, N. D. et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, n. 31, p. 235-240, 2000.

TOHILL, M.; TERENGHI, G. Stem cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. *Biotechnol Appl Biochem*, n. 40, p. 17-24, 2004.

USACH, V. et al. Bone marrow mononuclear cells migrate to the demyelinated sciatic nerve and transdifferentiate into Schwann cells after nerve injury: attempt at a peripheral nervous system intrinsic repair mechanism. *J Neurosci Res*, n. 89, p. 1203-1217, 2011.

VASCONCELOS-DOS-SANTOS, A. et al. Intravenous and intra-arterial administration of bone marrow mononuclear cells after focal cerebral ischemia: Is there a difference in biodistribution and efficacy? *Stem Cell Res*. v. 9, n. 1, p. 1-8, 2012.

VASCONCELOS DOS SANTOS, D. et al. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats. *Brain Research. Brain Res*, n. 1306, p. 149-158, 2010.

WALSH, S. K. et al. Fate of stem cell transplants in peripheral nerves. *Stem Cell Res*, v. 8, n. 2, p. 226-38, Mar. 2012.

WANG, Q. R. et al. Purification and growth of endothelial progenitor cells from bone marrow mononuclear cells. *J Cell Biochem*, n. 103, p. 21-29, 2008.

WEISSMAN I.; ANDERSON, D. J.; GAGE; F. H. Stem and progenitor cells origins, phenotypes, Lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*, n. 17, p. 387-403, 2001.

YIP, H. K. et al. Level and Value of Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients After Acute Ischemic. *Stroke*, n. 39, p. 69-74, 2008.

ZAVERUCHA-DO-VALLE, C. et al. Bone marrow mononuclear cells increase retinal ganglion cell survival and axon regeneration in the adult rat. *Cell Transplant*, n. 20, p. 391-406, 2011.

ZHANG, S. et al. Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD-34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation*, n. 110, p. 3803-3807, 2004.

Categoria Integração

Menção Honrosa

SISTEMA DE REALIDADE AUMENTADA PARA
USO NA REABILITAÇÃO MOTORA DE MEMBRO
SUPERIOR DE INDIVÍDUOS ACOMETIDOS POR
ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

Autores

Gilda Aparecida de Assis, 39 anos, brasileira, com doutorado completo

Roseli de Deus Lopes, 48 anos, brasileira, com doutorado completo

Maria Bernardete Rodrigues Martins, 53 anos, brasileira, com mestrado completo

Eloy Vicente de la Barra Velasquez, 44 anos, boliviano, com mestrado em curso

Sílvia Lemos Fagundes, 45 anos, brasileira, com mestrado completo

Alexandre Leuckert Klein, 25 anos, brasileiro, com ensino superior completo

Países: Bolívia e Brasil

Sistema de realidade aumentada para uso na reabilitação motora de membro superior de indivíduos acometidos por acidente vascular encefálico

1 Resumo

Este projeto apresenta uma nova proposta para a reabilitação física com tecnologia, em que um sistema de realidade aumentada (NeuroR), que proporciona a realimentação visual com conectividade, é utilizado na reabilitação motora de pacientes que sofreram um acidente vascular encefálico (AVE).

Em todas as partes do mundo, acidentes vasculares encefálicos têm causado incapacidade física em adultos, e até mesmo em crianças. As deficiências motoras provocadas por essa patologia caracterizam-se por paralisia ou fraqueza no lado do corpo oposto ao da lesão, gerando déficits no movimento do membro superior e na marcha. Vários recursos terapêuticos são utilizados com o intuito de reabilitar estes indivíduos, sendo que um deles, a prática mental, consiste em um método de treinamento no qual a reprodução interna de um determinado ato motor é repetida extensivamente, com a intenção de promover aprendizagem ou aperfeiçoamento de uma habilidade motora. Com base nessa técnica, desenvolveu-se o sistema NeuroR.

O NeuroR consiste em um sistema de realidade aumentada que permite investigar de que modo a percepção visual da movimentação de um braço virtual tridimensional, sobreposto à imagem do paciente e conectado ao ombro, substituindo o braço real lesado, contribui para a reabilitação motora desse membro comprometido.

Para avaliar a aplicabilidade do NeuroR, foram realizados dois estudos clínicos com pacientes, conduzidos por fisioterapeutas neurofuncionais.

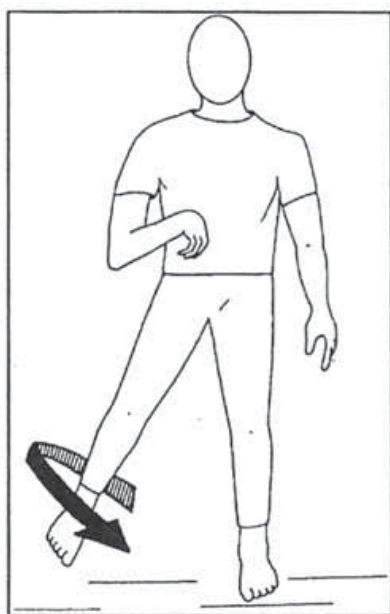
Ambos os estudos mostraram que os pacientes que utilizaram o sistema NeuroR tiveram melhorias nas amplitudes dos movimentos de abdução e flexão de ombro, medidas por fotogrametria.

Além disso, esse projeto proporcionou uma nova abordagem para o treinamento dos movimentos no processo de reabilitação motora, desde que mesmo pacientes sem qualquer saída motora no braço plégico possam treinar os movimentos, uma vez que o braço virtual, que é representado conectado ao corpo do paciente, expande as habilidades do braço real do paciente.

2 Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o AVE pode ser definido por um “sinal clínico de rápido desenvolvimento, de perturbação focal da função cerebral, de suposta origem vascular e com mais de 24 horas de duração” (STOKES, 2000). É considerado a terceira causa de morte em todo mundo, atrás apenas das doenças do coração e do câncer. Atinge homens, mulheres e até crianças, tendo maior incidência em idosos (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2009).

O AVE está entre as condições médicas mais frequentes, apresentando uma incidência de 200 mil casos/ano no Brasil. Tal condição acarreta grande perda funcional e, em decorrência, a dependência parcial ou total do indivíduo. Para Dobkin e Sacco (1995 apud CESÁRIO; PENASSO; OLIVEIRA, 2006), o afastamento do trabalho está ligado às sequelas deixadas pelo AVE.



O AVE tem como consequências danos residuais motores, sensitivos e cognitivos, além de uma diminuição na capacidade de suportar esforços, sendo considerado o principal motivo de incapacidade física em adultos em todo o mundo (OVANDO, 2009). A Figura 1 mostra o padrão patológico comum em pacientes que sofreram um AVE.

Figura 1. Padrão patológico pós-AVE (SULZBACHER, 2004).

A reabilitação é o principal meio utilizado para promover a recuperação funcional do paciente após um AVE, e tem como objetivos restabelecer o controle dos movimentos e melhorar a autonomia funcional do paciente (OVANDO, 2009). Recuperar a habilidade de mover o braço e de abrir a mão parece ser uma das maiores preocupações dos sujeitos hemiparéticos após o AVE, uma vez que as habilidades manuais permitem independência e têm impacto direto sobre as atividades da vida diária.

Diversas terapias de reabilitação podem promover a reabilitação física, cognitiva e psicossocial do indivíduo, e entre elas está a prática mental (NUDO; PLAUTZ; FROST, 2001).

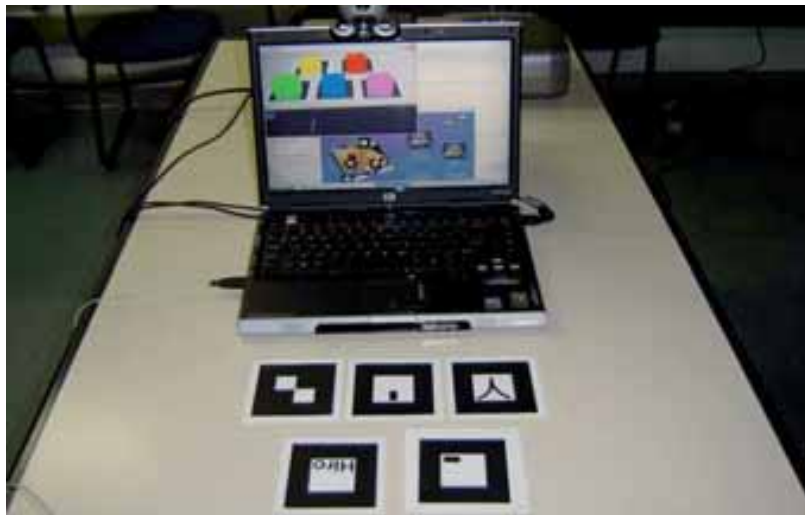
A prática mental é uma terapia de reabilitação que visa estimular a imagem motora do paciente. A imagem motora pode ser definida como um estado dinâmico no qual as representações de uma determinada ação motora são ensaiadas na memória de trabalho sem que haja necessariamente qualquer saída motora (DECETY, 1996). O trabalho descrito em Breitling, Guenther, Rondot (1986) relatou que ocorreram atividades similares nas áreas corticais quando as pessoas imaginavam o movimento dos dedos e quando efetivamente estavam executando os movimentos.

A tecnologia de Realidade Virtual (RV) tem sido explorada por seus benefícios na intervenção terapêutica para a recuperação de padrões de movimentos coordenados (BURDEA; COIFFET, 1994). Riva; Mantovani e Gaggioli (2004) afirmam que a RV oferece um conjunto de atributos atrativos para a reabilitação, e o mais explorado deve ser a habilidade de criar simulações tridimensionais da realidade que podem ser exploradas por pacientes sob a supervisão de um terapeuta. Outra vantagem dos sistemas de reabilitação baseados em realidade virtual é que, de forma similar aos jogos computacionais, os exercícios de reabilitação em RV podem ser desafiadores para o paciente, o que é importante para promover sua motivação (POPESCU, 2000). Treinamentos em realidade virtual podem trazer opções para o tratamento após o período de hospitalização e reabilitação financiado pelos planos de saúde, que é de aproximadamente 12 meses.

A Realidade Aumentada (RA) utiliza técnicas computacionais que geram, posicionam e mostram objetos virtuais integrados ao cenário real, em tempo real. Diferentemente da realidade virtual, que transporta o usuário para o ambiente virtual, a RA mantém o usuário no seu ambiente físico e transporta o ambiente virtual para o espaço do usuário, permitindo a interação

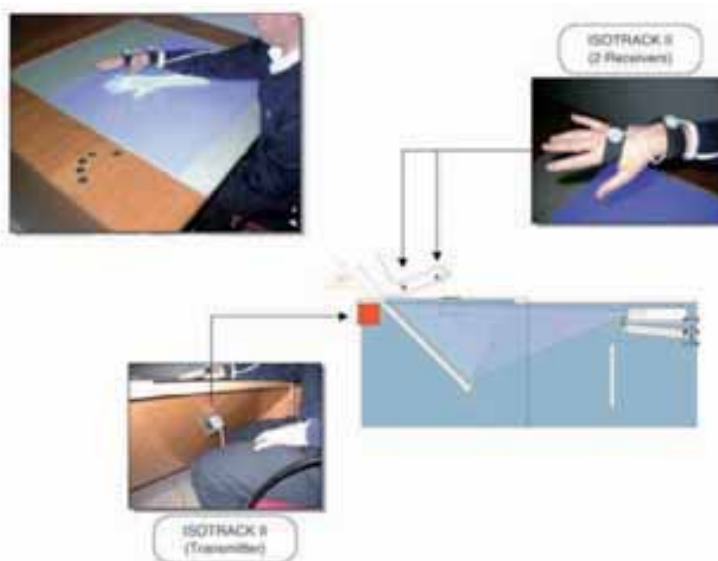
com o mundo virtual de maneira mais natural e sem necessidade de treinamento ou adaptação (TORI; KIRNER, 2006). A Figura 2 mostra um sistema de RA, no qual uma câmera captura a imagem dos marcadores colocados sobre a mesa e o sistema processa a imagem, posicionando cubos virtuais sob os marcadores na imagem.

Figura 2. Exemplo de RA, cubos virtuais na tela (CORREA et al., 2007).



Um protocolo clínico que utiliza um sistema denominado VR-MIRROR e as práticas física e mental é proposto em (GAGGIOLI et al., 2004). Os autores recorrem à tecnologia interativa para fornecer aos pacientes dicas visuais e auditivas para direcionar sua atenção para a estrutura dinâmica de um movimento, contribuindo assim para a geração da imagem motora.

Figura 3. Sistema de RV para a reabilitação motora (GAGGIOLI et al., 2007)



GAGGIOLI et al. (2007) apresentam os resultados da aplicação de VR-MIRROR a um grupo de nove pacientes pós-AVE, três vezes por semana, durante oito semanas. Cinco dos nove pacientes mostraram redução na deficiência ao final das oito semanas, sem perda do ganho motor após a alta. Os autores concluíram no artigo que esses resultados incentivam ainda mais investigações adicionais sobre o papel que a prática mental guiada por computador pode representar na reabilitação dos membros superiores.

Inspirados pelos resultados positivos obtidos com o sistema VR-MIRROR, elaboramos a proposta NeuroR, que combina realidade aumentada e prática mental para a reabilitação de membro superior de pacientes AVE crônicos. O sistema NeuroR fornece o estímulo visual do movimento de um braço virtual em realidade aumentada (o indivíduo visualiza a si mesmo e o cenário real ao seu redor, como em um espelho). Conectado ao corpo do paciente, substitui a imagem real do braço lesado por uma imagem virtual.

3 Objetivos

Esta pesquisa teve como objetivo geral pesquisar, projetar e desenvolver um sistema de realidade aumentada que torna possível verificar a viabilidade de sua aplicação na reabilitação motora dos membros superiores de pacientes hemiplégicos com lesão encefálica, utilizando a técnica de prática mental.

Para isso, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Concepção geral do sistema.
- Modelagem dos membros superiores de um ser humano sem amputações e com as suas principais articulações anatômicas e respectiva visualização em um ambiente de realidade aumentada.
- Posicionamento adequado do braço virtual sobre o braço real lesado e remoção do braço real da imagem para evitar a exibição de um membro fantasma.
- Levantamento e implementação das animações correspondentes às unidades de movimento necessárias para os exercícios previstos durante as intervenções terapêuticas.
- Seleção e implementação de mecanismos de aquisição de sinais bio-elétricos como forma de monitoramento e acompanhamento das atividades cerebrais do paciente durante a utilização do sistema e também como interface cérebro-computador.

- Testes e validação do sistema com uma amostra de pacientes, com o intuito de verificar se o sistema NeuroR promoveu ganho de Amplitude de Movimento (ADM) na flexão e abdução do ombro, na reabilitação de membro superior hemiparético de indivíduos acometidos por AVE, por intermédio da comparação entre o grupo experimental e o grupo controle.

4 Material e métodos

Esta seção descreve a metodologia adotada para a realização deste trabalho. Inicialmente, foram conduzidas reuniões com especialistas em medicina física e fisioterapeutas, para a caracterização do problema e levantamento dos principais requisitos do sistema. A seguir foi feito um estudo, de forma a prover uma fundamentação teórica quanto às viabilidades neurológica e técnica para o sistema proposto.

Depois de verificada a viabilidade neurológica e técnica da proposta, foi elaborado um estudo de alternativas e foi feita a seleção da tecnologia mais adequada para o desenvolvimento do sistema. Neste estudo foram levantados diversos aspectos e tecnologias relacionados a interfaces de realidade aumentada, como displays, calibração da câmera e métodos para combinação de imagens reais e virtuais. Foi feita também uma análise das tecnologias de hardware e software disponíveis, priorizando nas escolhas aquelas de baixo custo que pudessem satisfazer os requisitos levantados nas reuniões com especialistas.

Após o desenvolvimento do sistema, teve início o Estudo Clínico 1.

4.1. Estudo Clínico 1

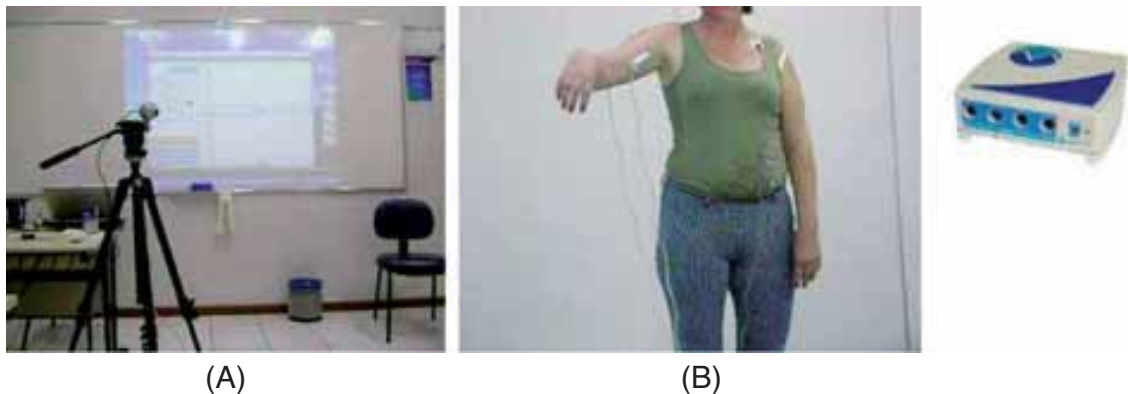
Oito indivíduos com AVE prévio foram admitidos no estudo, que ocorreu em setembro de 2009. Esses pacientes foram incluídos em um de dois grupos: grupo de terapia assistida por computador (Grupo Experimental – GE, N = 4) ou grupo de terapia física e mental (Grupo Controle – GC, N = 4). Ambos os grupos eram comparáveis em idade, deficiência física, assim como tempo entre o início do curso e a admissão no programa de reabilitação: a idade média para o GE foi de 50,5 anos, e para o GC foi de 59,5 anos; três indivíduos de cada grupo eram do sexo masculino e um era do sexo feminino. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi entregue e assinado pelos pacientes.

Ambos os grupos receberam terapia convencional. Durante quatro semanas, foram realizados quatro encontros com duração de uma hora.

O treinamento sensório-motor para o grupo experimental consistiu em uma sequência de imagens para a prática mental de abdução do ombro, flexão de ombro e flexão horizontal do ombro, disparada pelo fisioterapeuta. Seguiu-se outra sequência dos mesmos estímulos visuais para a prática física, desencadeadas pelos sinais de eletromiografia do braço comprometido. Todos os estímulos para o GE foram fornecidos pelo sistema NeuroR.

A infraestrutura utilizada nos testes é composta de tripé, webcam, projetor multimídia (Figura 4-A), aparelho de eletromiografia e eletrodos (Figura 4-B).

Figura 4. Infraestrutura



O instrumento utilizado foi a Escala Fugl-Meyer, aplicada antes da primeira sessão (pré-teste) e após as quatro sessões semanais (pós-teste).

O Estudo Clínico 2 ocorreu em 2010, conforme descrito a seguir.

4.2. Estudo Clínico 2

A pesquisa caracterizou-se por ser um estudo clínico do tipo estudo de caso experimental descritivo, com análise de dados sob paradigma qualitativo, contando com a participação de quatro indivíduos com idade entre 49 e 61 anos, diagnosticados clinicamente com AVE, divididos em grupo experimental e controle. O campo de estudo foi uma clínica-escola de fisioterapia pertencente a uma Instituição de Ensino Superior.

O estudo foi dividido em preliminar e principal. O estudo preliminar foi realizado em setembro de 2010, com a finalidade de verificar a necessidade de realizar ajustes e adequações nos instrumentos elaborados para a pesquisa, e contou com um indivíduo do sexo feminino. O estudo principal ocorreu no período de setembro a novembro de 2010.

Em ambos os estudos, preliminar e principal, foram utilizados os seguintes instrumentos: avaliação fisioterapêutica neurofuncional, escala modificada de Ashworth, biofotogrametria computadorizada, software Blender e o sistema NeuroR. Foram realizados oito encontros de 50 minutos cada, duas vezes por semana. Inicialmente, foi entregue aos pacientes o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que, após aceitação, foi assinado em duas vias.

Em seguida, foram realizadas as avaliações fisioterapêutica neurofuncional e de escala modificada de Ashworth. Os colaboradores foram divididos em dois grupos: controle, no qual, além da fisioterapia convencional, os pacientes realizavam a prática mental (PM) com o uso de um humanóide 3D desenvolvido no software Blender®; e grupo experimental, no qual, além da fisioterapia convencional, realizavam a prática mental com o uso do sistema NeuroR. No início e final de cada sessão foi realizado também o registro fotográfico dos participantes nos movimentos de flexão de ombro e abdução.

No grupo controle, os pacientes eram orientados a um processo de meditação, seguido da PM por estímulo visual, em um computador, dos movimentos de abdução e flexão de ombro, efetuados por um humanóide no Blender®.

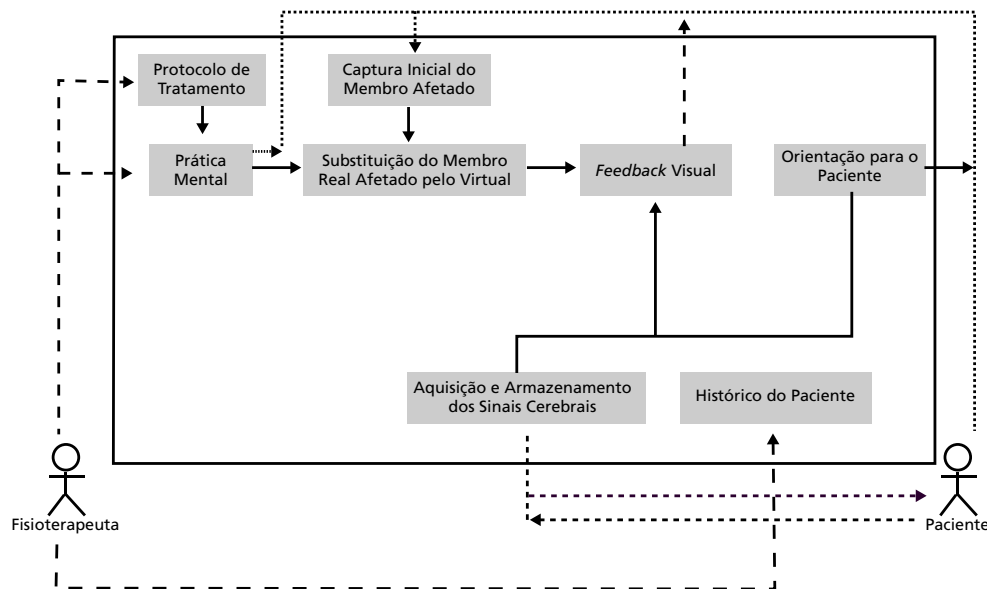
No grupo experimental, o fisioterapeuta realizava a captura e o armazenamento de duas imagens de fundo, e o sistema calibrava as cores da pele do participante e reproduzia a imagem dele de forma espelhada na lousa pelo projetor multimídia. Em seguida, o fisioterapeuta prendia o marcador no membro afetado, sendo que este se tornava invisível e era substituído pelo braço virtual.

Posteriormente, os pesquisadores ativavam os movimentos de abdução e flexão por meio do computador, para que o braço virtual realizasse os movimentos de flexão e abdução do ombro – ou seja, dava-se início à PM, em que o colaborador poderia optar por realizar os movimentos com o membro afetado juntamente com o membro virtual ou apenas visualizá-lo. Finalizado esse procedimento, era realizado novo registro fotográfico da flexão e abdução do ombro.

5 Resultados e discussão

Foi projetado e implementado um sistema computacional composto de oito módulos, como mostra a Figura 5.

Figura 5. Arquitetura do sistema NeuroR



Uma câmera de vídeo captura a imagem frontal do paciente. Um marcador fiducial, impresso, é fixado no ombro do membro plégico. O módulo “Captura Inicial do Membro Afetado” utiliza um software baseado em visão computacional para rastrear o marcador.

O módulo de “Substituição do Membro Real Afetado pelo Virtual” remove o braço paralisado da imagem e mistura a imagem com o braço virtual.

Cada quadro da câmera é processado por um computador que sobrepõe o gráfico 3D na imagem. O módulo “Feedback visual” mostra a imagem em RA na tela do computador. Durante a intervenção, o módulo “Feedback Visual” inicia a animação, que é disparada pelo operador do sistema.

Também foi desenvolvida uma interface cérebro-computador como parte do módulo de “Aquisição e Armazenamento dos Sinais Cerebrais”, para disparar o movimento do braço 3D durante a prática física. O sinal elétrico proveniente do músculo é capturado em tempo real e o RMS (Root Mean Square) correspondente é calculado por janelamento fixo. Quando o desvio padrão do RMS ultrapassa um determinado limiar, tem início a animação do braço virtual.

5.1. Recursos de desenvolvimento do sistema

Foram utilizados os seguintes recursos de hardware e software na implementação do NeuroR.

- Uma webcam com visor CCD (charge-coupled device) que captura imagens de tamanho 640x480 pixels com resolução de 1.3 megapixels a uma taxa de 30 frames/segundo.
- Compilador de linguagem de programação C.
- Software livre de modelagem 3D Blender.
- Exporter Cal3D: escrito na linguagem Python, que permite exportar modelos de personagens 3D desenvolvidos no Blender para o formato Cal3D (DESMECHT; DACHARY; HEIDELBERGER, 2007).
- ARToolKit: biblioteca, escrita em C, que permite aos programadores desenvolver aplicações de RA de forma rápida. O pacote inclui bibliotecas de rastreamento e disponibiliza o código-fonte completo (GEIGER; SCHMIDT; STOCKLEIN, 2004).
- Biblioteca GTK para construção da interface gráfica do sistema.
- Banco de dados MySQL.
- Aparelho para aquisição de EMG e eletrodos. Foi utilizado um aparelho comercial desenvolvido por uma empresa brasileira.
- Biblioteca para acesso ao aparelho de EMG, escrita em C-sharp, desenvolvida pela empresa distribuidora do equipamento e disponibilizada exclusivamente para a pesquisa a partir de contato feito pelos pesquisadores envolvidos no projeto.

A biblioteca ARToolKit utiliza técnicas de visão computacional para calcular posição e orientação de marcadores, identificados no cenário real, a partir das sequências de vídeo capturadas por uma webcam, possibilitando a sobreposição de objetos virtuais nos marcadores.

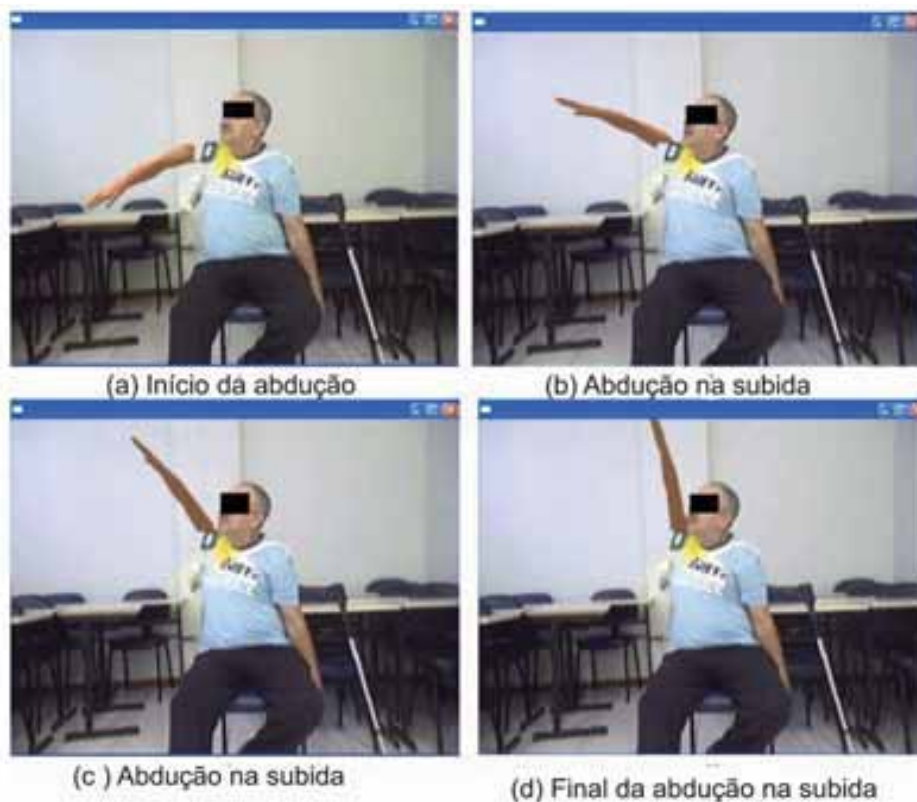
O ciclo básico da execução da biblioteca ARToolKit compreende os seguintes passos: inicialmente a imagem do mundo real é capturada por um dispositivo de entrada de vídeo para dar início à identificação dos marcadores; a imagem real capturada é transformada em imagem binária; esta imagem é analisada em busca de regiões quadradas. Ao encontrar uma região quadrada, a ferramenta calcula a posição e a orientação da câmera em relação a esta região, buscando identificar figuras específicas, denominadas marcadores. Os marcadores são símbolos distintos e previamente cadastrados por meio de um treinamento da rede neural da biblioteca

ARToolKit para seu reconhecimento efetivo. Uma vez reconhecido o marcador, a ferramenta calcula o ponto que o objeto virtual deve ocupar no mundo real e realiza a sobreposição das imagens, retornando ao usuário a combinação visual do mundo real e do objeto virtual.

5.2. Estudo Clínico 1

A Figura 6 mostra uma sequência de imagens capturadas em tempo real, que foram visualizadas pelo paciente na tela de projeção durante uma sessão com o NeuroR. O paciente pertence ao Grupo Experimental, apresenta hemiplegia esquerda, e o exercício executado pelo braço virtual corresponde à abdução de ombro de 0 a 180 graus.

Figura 6. Paciente A utiliza abdução no NeuroR



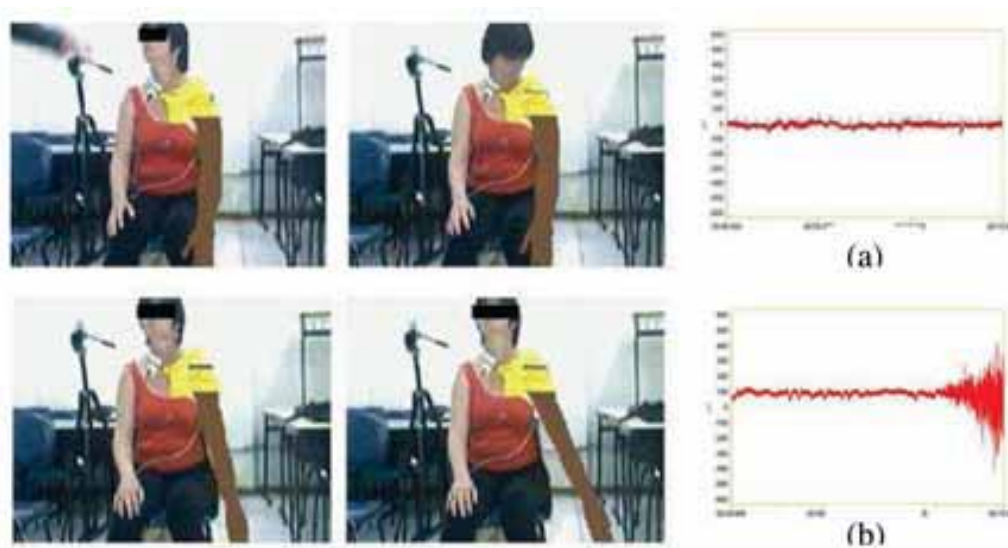
A Figura 7 mostra uma sequência de imagens durante uma sessão com o NeuroR, na qual o paciente do GE apresenta hemiplegia direita e o exercício executado pelo braço virtual corresponde à flexão de ombro de 0 a 180 graus.

Figura 7. Paciente B utiliza flexão no NeuroR



A Figura 8 mostra a paciente C utilizando o sistema NeuroR para realizar a abdução. O movimento foi disparado quando o sinal de eletromiografia (EMG) do músculo deltoide do membro comprometido atingiu um determinado limiar.

Figura 8. Paciente C utiliza abdução no NeuroR disparado pelo EMG



A coleta de dados foi feita por meio de testes de desempenho motor nos quais os pacientes realizaram tarefas utilizando os itens motores da escala Fugl-Meyer para membro superior. Este instrumento é uma medida cumulativa das deficiências motoras do paciente e avalia motricidade voluntária, coordenação, tato e propriocepção, mobilidade passiva, dor à movimentação passiva e equilíbrio (FUGL-MEYER et al., 1975). A escala Fugl-Meyer para extremidade superior é composta de 33 tarefas com três escalas ordinais de pontuação (0-2), com pontuação máxima de 66.

Na comparação entre os resultados totais do instrumento Fugl-Meyer aplicado no pré-teste e pós-teste, verificou-se um aumento da pontuação total para todos os pacientes do GE e também do GC. Entretanto, este aumento foi consideravelmente menor no GC quando comparado ao GE.

Tabela I. Desempenho motor dos pacientes medido pela escala Fugl-Meyer

Paciente	Grupo	Lado da hemiplegia	Antes	depois
A	EG	Esquerdo	09	14 (56%)
B	GE	Direito	16	26 (62%)
C	EG	Direito	31	44 (42%)
D	EG	Direito	35	41 (17%)
E	GC	Esquerdo	21	24 (14%)
F	GC	Esquerdo	46	51 (11%)
G	GC	Direito	53	55 (4%)
H	GC	Esquerdo	38	42 (10%)

A Figura 9 mostra a paciente C executando a tarefa de abdução de ombro de 0 a 90 graus da escala Fugl-Meyer no pré-teste e no pós-teste. Pode-se observar, na figura, um aumento de 93 para 96 graus na amplitude da abdução do membro superior comprometido.

Figura 9. Paciente C faz abdução de 0 a 90 graus durante teste Fugl-Meyer



Pré-teste: abdução 0 a 90 braço bom



Pré-teste: abdução 0 a 90 braço afetado



Pós-teste: abdução 0 a 90 braço bom



Pós-teste: abdução 0 a 90 braço lesado

5.3 Estudo Clínico 2

A amostra do estudo foi constituída por quatro indivíduos adultos, sendo três do sexo masculino e um do sexo feminino. Nesse estudo, o hemisfério acometido pelo AVE foi predominantemente o direito (75%). A idade média dos indivíduos foi de 54,25 anos. Entre os fatores de risco não modificáveis, a idade é o mais forte determinante dos AVEs, pois quanto maior, mais alta é a incidência dessa patologia (SACCO, 2002).

A PM de imagens internas, tanto no Grupo Experimental (GE) quanto no Grupo Controle (GC), foi realizada pelo próprio participante. Propunha-se que ele se imaginasse realizando os movimentos de abdução e flexão com o membro superior afetado normalmente, sem apresentar sequela alguma. No GC, a PM de imagens externas deu-se por intermédio do humanóide em 3D desenvolvido no Blender®, que realizava movimentos de abdução e flexão do ombro de forma contínua. No GE, a PM de imagens externas foi realizada com o sistema NeuroR, no qual o colaborador visualizava a si próprio como em um espelho, com o braço virtual acoplado a seu corpo, realizando os movimentos.

A Figura 10 apresenta o participante Girassol realizando a abdução e flexão do ombro no primeiro dia do estudo. O registro fotográfico foi realizado antes de o participante ser submetido à utilização do sistema NeuroR.

Figura 10. Participante Girassol no primeiro dia do estudo, com ângulos de 46 graus na abdução (esquerda) e 55 graus na flexão (direita)



A Figura 11 mostra o participante Girassol no oitavo e último dia do estudo, realizando os movimentos propostos após o uso do NeuroR.

Figura 11. Participante Girassol no último dia do estudo



Verifica-se, na Tabela 2, a Amplitude de Movimento (ADM) de abdução e flexão do ombro no primeiro e no último dia do estudo para os participantes tanto do GE quanto do GC.

Ao analisar a Tabela 2, constata-se que todos os participantes apresentaram ganhos significativos. No grupo experimental, esse ganho teve prevalência do movimento de abdução do ombro, enquanto que no Grupo Controle, ocorreu, prevalência do movimento de flexão do ombro.

Tabela 2. Mensuração e ganho de ADM obtido

Colaboradores	Grupo	Movimento	ADM no 1º dia	ADM no 8º dia	Ganho ADM
Girassol	GE	Abdução	46	80	34
		Flexão	55	76	21
Lírio	GE	Abdução	62	91	29
		Flexão	69	93	24
Cravo	CC	Abdução	23	31	08
		Flexão	31	50	19
Margarida	GC	Abdução	12	21	09
		Flexão	20	38	18

6. Conclusões

O objetivo desta pesquisa – proporcionar um aparato tecnológico para a realimentação visual com conectividade na reabilitação motora dos membros superiores de pacientes pós-AVE – foi atingido com o desenvolvimento do sistema NeuroR. Com base nos estudos clínicos realizados, há indícios de que este sistema possa ser utilizado para promover a reabilitação física como um tratamento adicional para a reabilitação do paciente.

Por meio dos dois estudos, verificou-se que o sistema NeuroR mostrou-se eficaz na reabilitação de indivíduos acometidos por AVE, proporcionando uma melhora no desempenho motor do membro superior na abdução e flexão do ombro.

Este trabalho proporcionou uma nova abordagem para o treinamento dos movimentos no processo de reabilitação motora, desde que mesmo pacientes sem qualquer saída motora no braço plégico possam treinar os movimentos, uma vez que o braço virtual, que é representado conectado ao corpo do paciente, expande as habilidades do braço real do paciente.

Além disso, este sistema pode ser utilizado tanto no centro de reabilitação quanto em outros locais. A simulação dos exercícios pelo braço virtual pode ajudar os pacientes e seus cuidadores a executar os exercícios de reabilitação motora em diferentes cenários de reabilitação.

Este sistema também poderá ser empregado em outras articulações; pode, ainda, fazer parte do tratamento fisioterapêutico em outras áreas, como desportiva, traumatismo e ortopedia. Cabe salientar que deverá estar sempre associado à fisioterapia conservadora.

7. Referências bibliográficas

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Heart Disease and Stroke Statistics 2009. Update At a Glance, 2009. Disponível em: <<http://www.americanheart.org/downloadable/heart/123783441267009Heart%20and%20Stroke%20Update.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2009.

BREITLING, D.; GUENTHER, W.; RONDOT, P. Motor responses measured by electrical activity mapping. *Behaviour Neuroscience*, v. 100, p. 104-116, 1986.

BURDEA, G.; COIFFET, P. *Virtual Reality Technology*. New York: Wiley, 1994.

CORRÊA, A. G. D. et al. GenVirtual: um jogo musical, em realidade aumentada, para auxílio à reabilitação física e cognitiva de indivíduos com necessidades especiais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE INFORMÁTICA NA EDUCAÇÃO, 18. São Paulo, 2007. Anais..., v. 1. São Paulo: Sociedade Brasileira de Computação, 2007. p. 381-390.

DECETY, J. The neurophysiological basis of motor imagery. *Behavioural Brain Research*, n. 77, p. 45-52, 1996.

DESMECHT, L.; DACHARY, L.; HEIDELBERGER, B. *The Cal3D User's Guide*, 2006. Disponível em: <<http://download.gna.org/cal3d/documentation/guide/>>. Acesso: fev. 2012.

DOPKIN, B; SACCO, R. L. apud CESÁRIO, C. M. M.; PENASSO, P.; OLIVEIRA, A. P. R.. Impacto da disfunção motora na qualidade de vida em pacientes com Acidente Vascular Encefálico. *Revista Neurociências*, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 6-9, jan./mar. 2006.

FUGL-MEYER, A. R. et al. The post-stroke hemiplegic patient: a method for evaluation of physical performance. *Scand J Rehab Med*, n. 7, p. 13-31, 1975.

GAGGIOLI, A. et al. Training with Computer-Supported Motor Imagery in Post-Stroke Rehabilitation. *CyberPsychology & Behavior*, v. 7, n. 3, p. 327-332, 2004.

GAGGIOLI, A. et al. Computer-enhanced mental practice in upper- limb rehabilitation after cerebrovascular accident: a case series study. *Virtual Rehabilitation*, p.151-154, 27-29 set. 2007.

GEIGER, C.; SCHMIDT, T.; STOCKLEIN, J. Rapid Development of Expressive AR Applications. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MIXED AND AUGMENTED REALITY (ISMAR), Washington DC (USA), Nov. 2-5, 2004. Proceedings... USA: IEEE Computer Society, 2004.

NUDO, R. J; PLAUTZ, E. J.; FROST, S. B. Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle Nerve*, v. 24, p. 1000-1019, 2001.

OVANDO, A. C. Acidente vascular encefálico: comprometimento motor dos membros inferiores e alteração da marcha. *Revista Digital*. Buenos Aires, a. 14, n. 132, mai. 2009, Disponível em <<http://www.efdeportes.com/efd132/acidente-vascular-encefalico-na-alteracoes-na-marcha.htm>>.

POPESCU, V. G. et al. A Virtual Reality-based Telerehabilitation System with Force Feedback. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, v. 4, n. 1, p. 45-51, 2000.

RIVA, G.; MANTOVANI, F; GAGGIOLI, A. Presence and rehabilitation: toward second-generation virtual reality applications in neuropsychology. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, 2004.

SACCO, R. L. Patogênese, classificação e epidemiologia das doenças Vasculares o artigo cerebrais: Merrit Tratado de Neurologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 184-194.

STOKES, M. *Neurologia para fisioterapeutas*. São Paulo: Premier, 2000.

SULZBACHER, M. E. A avaliação do tape na marcha de pacientes com doença vascular encefálica. 2005. Monografia (Conclusão do Curso de Fisioterapia) – Feevale, Novo Hamburgo – RS.

TORI, R.; KIRNER, C. Fundamentos de realidade aumentada. In: TORI, R.; KIRNER, C.; SISCOUTO, R. Fundamentos e tecnologia de realidade virtual e aumentada: livro do Pré-Simpósio; VIII Symposium on Virtual Reality, Belém –PA, 2006. p. 22-38.

Nota sobre os autores

Categoria Iniciação Científica – 1º Lugar

Kathya Linette Mimbela Barrera (autora del trabajo), 16 años, peruana. Estudiante del cuarto año de Secundaria del Colegio Particular «San Roque» en el distrito de Santiago de Surco, Perú. Logros: Primer lugar de la Región Lima Metropolitana 2010-2011, en la categoría Investigación Científica, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú (CONCYTEC).

Luis Ernesto Mimbela Quispe (profesor orientador del trabajo), 44 años, peruano. Tecnólogo Laboratorista Clínico, I.S.T. «Federico Villareal». Especialización práctica en la Sanidad de las Fuerzas Policiales del Perú. Profesor en biología, química y bioquímica del colegio particular San Roque (Consortio de Colegios Católicos del Perú). Logros: representó al Perú como asesor del proyecto en la Feria Internacional: ESI-AMÉRICA LATINA 2005 en Santiago de Chile (Categoría: Ciencias de la Tierra); asesor del proyecto que representó al Perú en la Feria Internacional MILSET 2006 en Veracruz, México (Categoría: Bioquímica); asesor del proyecto finalista del Perú a la Feria Internacional ESI 2009 Túnez, África (Categoría: Bioquímica); y asesor del Primer Lugar Regional – Lima Metropolitana 2010-2011 por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú (CONCYTEC) (Categoría: Investigación Científica).

Categoria Estudante Universitário – 1º Lugar

Ivan Lavander Candido Ferreira (autor do trabalho), 21 anos, brasileiro, graduando em Ciências Biológicas pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – USP. Durante sua graduação, recebe apoio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do Instituto Butantan/CNPq (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico), sob orientação do Prof. Dr. Pedro Ismael da Silva Junior, na área de Química de Macromoléculas. Trabalha na caracterização de moléculas bioativas, como toxinas de aranhas. Em 2011, recebeu o Prêmio Jovem Cientista do Instituto Butantan pela identificação de peptídeos antimicrobianos no veneno da aranha *Nephilengys cruentata*.

Pedro Ismael da Silva Junior (Professor-orientador do trabalho), 55 anos, brasileiro, graduado em Ciências Biológicas (1979) e doutor em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro – 2000) pela Universidade de São Paulo. Atualmente é pesquisador científico V do Instituto Butantan, trabalhando no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, com sistema imune inato em artrópodes, principalmente com peptídeos antimicrobianos. É também orientador do programa de pós-graduação Interunidades em Biotecnologia (ICB-USP). Iniciou suas atividades de pesquisa e docência como assistente técnico de pesquisa no Instituto Butantan em março de 1994, passando a pesquisador científico I em dezembro de 1994. É coautor de 26 publicações, dois capítulos de livros, manuais técnicos, quatro patentes, além de colaborador de diversos pesquisadores de diferentes instituições.

Categoria Jovem Pesquisador – 1º Lugar

Rafael Polidoro Alves Barbosa, 27 anos, brasileiro, biólogo; bacharel (2008), mestre (2010) e doutorando em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, sempre com auxílio do CNPq. Foi bolsista de iniciação científica na Fiocruz-MG de 2006 a 2009; recebeu em 2008 as premiações de “três melhores trabalhos” do CPqRR e “dez melhores trabalhos” de iniciação científica da Reunião Anual de IC da Fiocruz. Ainda nesse período, participou do desenvolvimento de duas patentes. Em 2011,

foi considerado o melhor resumo de doutorado no Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia; ganhou Certificado de Mérito e Melhor Apresentação Oral no N. D. Virologia Molecular pela Asociación de Universidades Grupo Montevideo. É especialista em vacinas utilizando vírus recombinantes.

Categoria Integração – 1º Lugar

Claudio Javier Salomon, 49 años, argentino. Graduado en Farmacia por la Universidad de Rosario (1987) y doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Rosario (1993). Posdoctorado en la Universidad Hebrea de Jerusalén (Israel 1993-1997). Director de 2 tesis doctorales y 5 tesinas. Autor de 30 publicaciones en revistas internacionales con referatos. Profesor asociado de Tecnología Farmacéutica (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad de Rosario. Investigador independiente del Instituto de Química de Rosario-CONICET. Miembro de comités evaluadores y comités editoriales de revistas científicas internacionales.

Darío Leonardi, 38 años, argentino. Farmacéutico, egresado de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario (UNR) en 2001. Doctor en Cs. Químicas en 2007 título de tesis «Dispersiones sólidas, polímeros modificados y agentes tensioactivos aplicados a la disolución de fármacos. Diseño de nuevas formulaciones farmacéuticas». Formación posdoctoral 2007-2010 tema «Sistemas microparticulados orales para la administración modificada de drogas. Aplicación de diseños experimentales para optimizar los parámetros biofarmacéuticos». Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Argentina (CONICET) en el Instituto de Química de Rosario (IQUIR) desde 2010. Docente del Área Tecnología Farmacéutica desde 2006, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR), Argentina.

Marcílio Sérgio Soares da Cunha Filho, 31 anos, brasileiro, graduado em Farmácia pela Universidade Federal de Pernambuco (2003). Possui Diploma de Estudos Avançados (DEA) em Tecnologia Farmacêutica (2006), doutorado em Farmácia e Tecnologia Farmacêutica pela Universidad de Santiago de Compostela, Espanha (2007), e pós-doutorado na área de

biotecnologia e biologia molecular na Universidad de Santiago de Compostela, Espanha (2008). Atualmente é professor adjunto da Universidade de Brasília (UnB). Possui mais de 75 publicações científicas, entre artigos, resumos em congressos e patentes. Orientou mais de 20 alunos de graduação e pós-graduação.

María Celina Lamas, 44 años, argentina. Graduada en Farmacia por la Universidad de Rosario (1993) y doctora en Ciencias Químicas por la Universidad de Rosario (1998). Directora de 2 tesis doctorales. Autor de 22 publicaciones en revistas internacionales con referatos. Profesora adjunta de Tecnología Farmacéutica (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad de Rosario. Investigadora Adjunta del Instituto de Química de Rosario (CONICET). Miembro de comités evaluadores y comités editoriales de revistas científicas internacionales.

Lívia Cristina Lira de Sá Barreto, 33 anos, brasileira, professora adjunta da Universidade de Brasília (UnB), lotada no curso de Farmácia da Faculdade de Ceilândia (FCE). Graduada em Farmácia pela Universidade Federal de Pernambuco (2011) e mestre em Ciências Farmacêuticas nessa mesma universidade (2004). Estudou na Universidad de Santiago de Compostela, Espanha, onde obteve Diploma de Estudos Avanzados (DEA) em 2006 e título de doutora em 2009 na área de tecnologia farmacêutica. Tem experiência na área de farmácia, com ênfase em química de produtos naturais, controle de qualidade e tecnologia farmacêutica.

Categoria Iniciação Científica – Menção Honrosa

David Richer Araujo Coelho (autor do trabalho), 16 anos, brasileiro, aluno do segundo ano do ensino médio no Colégio Municipal Francisco Porto de Aguiar e do curso de meio ambiente do Instituto Federal do Rio de Janeiro, ambos na cidade de Arraial do Cabo (RJ). Desde 2011 atua no projeto do MosquiFAIL, finalizado em agosto de 2012. Destaca-se na produção literária, tendo sido premiado pela Academia Brasileira de Letras por escrever uma das dez melhores redações do Brasil no concurso Barão do Rio Branco. Além dessa premiação, e demonstrando grande interesse pelas pesquisas científicas, o aluno produziu uma redação que foi publicada no site da

NASA, no concurso “Cientista por um dia”, sendo considerada uma das melhores do país. Pretende fazer o curso de medicina, a fim de atuar em pesquisas sobre Alzheimer e possível cura para a doença.

Categoria Estudante Universitário – Menção Honrosa

Angelo Luis Caron (autor do trabalho), 23 anos, brasileiro, bacharelado de Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). É bolsista de iniciação científica da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), com projeto desenvolvido na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto sob orientação da Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes. Durante a graduação, participou ativamente do Centro Estudantil da Biologia, organizando diversos eventos, entre os quais a Semana de Bio-Estudos.

Aparecida Maria Fontes (professora-orientadora do trabalho), brasileira, doutora em Biologia Celular e Molecular pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP – USP) (1996). Fez um primeiro pós-doutorado no Departamento de Genética da Case Western Reserve University, Cleveland, EUA (1997), e um segundo pós-doutorado na mesma Universidade, no Departamento de Oncologia/Hematologia (2000). Em 2001, retornou ao Brasil, onde exerce suas atividades como pesquisadora-científica-tecnológica II do Hemocentro de Ribeirão Preto (FMRP/USP), atuando na área de proteínas recombinantes da coagulação e, mais recentemente, biologia sintética como opção terapêutica para hemofilia A. É professora do programa de pós-graduação do Departamento de Genética e Clínica Médica da FMRP/USP, e responsável pelo Laboratório de Transferência Gênica do Hemocentro, onde atua também na área de células-tronco e terapia celular e biologia da célula tumoral.

Categoria Jovem Pesquisador – Menção Honrosa

Vanina Usach, 31 años, argentina, Licenciada en Ciencias Biológicas desde 2006 de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Ayudante de Primera en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA. Actualmente concluye el doctorado en el área de Neurociencias en la UBA, trabajando principalmente en un modelo de desmielinización-remielinización del sistema nervioso periférico y el papel de las células pluripotentes en dicho modelo experimental. Asistió a cursos de posgrado y escuelas internacionales relacionadas con su tema de tesis, posee 2 publicaciones en revistas internacionales y numerosas presentaciones en congresos nacionales (Argentina) e internacionales.

Categoria Integração – Menção Honrosa

Gilda Aparecida de Assis, 39 anos, brasileira, graduada em Informática pela Universidade Federal de Viçosa (1994). Possui doutorado em Ciências pela Universidade de São Paulo (2010) e mestrado em Informática pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1998). Foi professora titular do curso de Ciências da Computação da Universidade Feevale de 1998 a 2012. Em 2012, foi aprovada em concurso público para professor adjunto na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Atualmente é bolsista CNPq DTI-A da Universidade de São Paulo. Tem experiência nas áreas de reabilitação neurológica, realidade virtual, imagem funcional e interface cérebro-computador.

Roseli de Deus Lopes, 48 anos, brasileira, professora-associada do Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo (EP-USP). Graduada (1987), mestre (1993), doutora (1998) e livre-docente (2007) em Engenharia Elétrica pela EP-USP. Vice-coordenadora do Centro de Instrumentação em Tecnologias Interativas (CITI-USP), Núcleo de Apoio à Pesquisa da USP criado em 2011. Foi vice-diretora (2006 a 2008) e diretora (2008 a 2010) da Estação Ciência da USP, Centro de Difusão Científica, Tecnológica e Cultural da Pró-Reitoria de Cultura e Extensão Universitária da USP. Desde 1988 é pesquisadora do

Laboratório de Sistemas Integráveis da EP-USP, onde é líder do Grupo de Pesquisa em Meios Eletrônicos Interativos. Coordena projetos de pesquisa na área de meios eletrônicos interativos, com ênfase em aplicações voltadas para educação e saúde. Coordena projetos de divulgação científica e projetos voltados à identificação e ao desenvolvimento de talentos em ciências e engenharia. Foi responsável pela concepção e pela viabilização da FEBRACE (Feira Brasileira de Ciências e Engenharia), e desde 2003 atua como coordenadora geral da FEBRACE. É a atual coordenadora acadêmica do Programa A USP e as Profissões da Pró-Reitoria de Cultura e Extensão Universitária da USP. Faz parte do grupo de trabalho de assessoria técnica e pedagógica do Programa UCA – Um Computador por Aluno, promovido pelo MEC. É membro titular do Conselho Deliberativo do Museu de Ciências da USP. Tem publicado e atuado como revisora de artigos científicos em revistas da IEEE e em conferências nacionais e internacionais. Recebeu 16 premiações nacionais e internacionais de 1980 a 2011.

Maria Bernardete Rodrigues Martins, 53 anos, brasileira, licenciada em Ciências 1º Grau pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (1988); graduada em Fisioterapia pela Universidade Federal de Santa Maria (1994); mestre em Engenharia de Produção pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2004), com ênfase em ergonomia. Atua como professora assistente do curso de Fisioterapia na Universidade Feevale desde 1994, tendo sido coordenadora do curso de Fisioterapia de 2004 a 2006. Tem experiência na área de fisioterapia e terapia ocupacional, com ênfase em fisioterapia neurológica, atuando principalmente nos seguintes temas: paralisia cerebral, qualidade de vida, inclusão escolar, ergonomia e tecnologia assistiva.

Eloy Vicente de la Barra Velasquez, 44 anos, boliviano, graduado em Engenharia Elétrica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (2009). Atualmente é mestrando em Engenharia Elétrica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Atuou como especialista de implantação de sistemas de telecomunicação na Ericsson do Brasil e em O&M na Ericson Gestão e Serviços de Telecomunicações, de 1998 a 2007. Atualmente é especialista em telecomunicações na Alcatel Lucent Telecomunicações. Tem experiência nas áreas de engenharia elétrica, com ênfase em telecomunicações eletrônica e engenharia biomédica, com pesquisas na área de Mobile Health (mHealth).

Sílvia Lemos Fagundes, 45 anos, brasileira, graduada em Fisioterapia pelo Centro Universitário do Instituto da Igreja Metodista (IPA); especialista em Administração Hospitalar pelo Instituto de Administração Hospitalar e Ciências da Saúde de Porto Alegre (IACHS); mestre em Engenharia Elétrica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Atualmente é bolsista de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial nível B do CNPq pelo Centro de Microgravidade (PUC-RS). É fisioterapeuta voluntária do projeto social Interabilita-FECI, do Sport Club Internacional, e professora convidada das especializações: fisioterapia músculo-esquelética, na Universidade Feevale (Novo Hamburgo); fisioterapia neurofuncional, na Federação da Serra Gaúcha (Caxias do Sul); ergonomia, no Instituto de Administração Hospitalar e Ciências da Saúde (Porto Alegre); neuropsicopedagogia, no Censupg (Santa Catarina); fisioterapia neurofuncional, no Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo (IESA). Autora do livro *Entre cenas sempre fisioterapêuticas*.

Alexandre Leuckert Klein, 25 anos, brasileiro, graduado em Ciências da Computação pela Universidade Feevale (2010). Desenvolveu como projeto de graduação uma versão sem marcadores para o Sistema de Realidade Aumentada para uso na reabilitação motora de membro superior de indivíduos acometidos por acidente vascular encefálico. Atualmente é diretor da empresa ActiveHouse, que atua na área de domótica.

Nota sobre os membros da Comissão de Avaliação

Professor Ary Mergulhão Filho, UNESCO/Brasil, Presidente da Comissão de Avaliação

Brasileiro, mestre em Ciências pelo Instituto Tecnológico da Aeronáutica (ITA). Atuou como empresário e consultor de empresas. Orientou mais de 60 trabalhos acadêmicos em 19 anos de atuação como professor universitário. Na esfera pública, atuou no Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e no Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, na formulação e implantação de políticas para o setor. Atualmente é Oficial de Ciência e Tecnologia da UNESCO no Brasil.

Professor Carlos Alberto Fossati, Representante da RECyT/Argentina Argentino. Doctor en Bioquímica, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (1976). Investigador principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Profesor titular de Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Áreas de trabajo: inmunología, enfermedades infecciosas, hipersensibilidad. Autor de más de 110 artículos originales, varios libros y capítulos de libros, director de 15 tesis doctorales. Nueve premios y distinciones nacionales y dos internacionales por trabajos científicos. Coautor de dos patentes nacionales y dos internacionales. Organizador de numerosas reuniones y congresos nacionales e internacionales. Jurado y evaluador para organismos y publicaciones científicas argentinas e internacionales. Jefe del Departamento de Ciencias Biológicas y Consejero Académico de la FCE, UNLP. Expresidente de la Sociedad Argentina de Inmunología.

Professor Dácio Eduardo Leandro Campos, Representante da RECyT/Brasil Brasileiro, com bacharelado e licenciatura em Biomedicina, com especialização em patologia clínica, citologia oncótica e análise ambiental, reconhecidos pela ABBM-Brasil. Ex-reitor do Centro Universitário Barão de Mauá de Ribeirão Preto (SP); ex-presidente e atual diretor do Conselho Federal de Biomedicina; foi avaliador do MEC (de curso e institucional) e atualmente é membro da Residência Multiprofissional da área de saúde no MEC; responsável técnico pela implantação do Hospital-Escola de Medicina da Santa Casa de Ribeirão Preto (SP), onde foi provedor por mais de dez anos. Atualmente é presidente do Conselho Regional de Biomedicina de São Paulo – 1ª Região e responsável técnico pelos laboratórios da Beneficência Portuguesa e da Santa Casa de Ribeirão Preto.

Professor Edson Zangrando Figueira, Representante da RECyT/Brasil Brasileiro, graduado em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Estadual de Londrina (1996); especialização em Bioquímica Aplicada pela Universidade Estadual de Londrina (1997); mestrado em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina (1999); doutorado em Ciências de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina/Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN-México (2003); e pós-doutorado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (2005). Atualmente é pró-reitor acadêmico do Centro Universitário Unieuro.

Professor Kleber Franchini, Representante da RECyT/Brasil Brasileiro, médico (1984), graduado pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro; especialização em cardiologia (1987) pelo Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia; doutorado em Fisiologia Humana (1991) pela Universidade de São Paulo; pós-doutorado (1993-1995) pelo Medical College of Wisconsin; professor titular de clínica médica – cardiologia (2009) na Universidade Estadual de Campinas; diretor do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM – 2009); Pesquisador 1A do CNPq; interesse científico em mecanismos moleculares da insuficiência cardíaca e desenvolvimento de fármacos.

Professor Eduardo Osinaga, Representante da RECyT/Uruguai
Uruguayo, médico (1984) por la Facultad de Medicina, Universidad de la República (Uruguay). Maestría (1989) y doctorado (1992) en Biotecnología por la Universidad de Tecnología de Compiègne (Francia). Actualmente es profesor titular del Departamento de Inmunobiología de la Facultad de Medicina, Universidad de la República (Uruguay) e investigador principal del Instituto Pasteur de Montevideo, responsable del Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral. Investigador del Sistema Nacional de Investigadores (Nivel III). Ex coordinador general del Programa AMSUD-Pasteur (2005-2008). Investigador y docente en áreas vinculadas a la inmunología, la oncología y la glicobiología. Caballero de la Orden de las Palmas Académicas (Francia), Gran Premio Nacional de Medicina (Uruguay) y Premio Claude Bernard (Francia-Uruguay).

2012

prêmio MERCOSUL DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA

premio MERCOSUR DE
CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Tema: **Inovação tecnológica na saúde**



A edição 2012 do Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia, voltada para o tema “inovação tecnológica na saúde”, premia oito trabalhos que estão publicados neste livro. Os trabalhos representam potencial contribuição para o desenvolvimento científico e tecnológico dos países do MERCOSUL, e foram desenvolvidos por estudantes de ensino médio, universitários, pesquisadores graduados e doutores da área.

PATROCÍNIO PATROCINIO

Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



APOIO APOYO



Centro de Gestão e Estudos Estratégicos
Ciência, Tecnologia e Inovação

ORGANIZAÇÃO ORGANIZACIÓN



Representação
no Brasil

