

Universidade Estadual Paulista (Unesp)
 Processo 1997/06292-9
 Vigência: 1/3/1998 a 31/5/2002

Estima-se que, aproximadamente, 50% dos fetos abortados espontaneamente durante o primeiro trimestre de formação apresentem malformações. A etiologia mais comum é genética, mais especificamente citogenética, envolvendo cromossomopatias. Estas originam-se de erros na gametogênese ou podem ser herdadas dos pais. Ambas as situações envolvem risco de recorrência para novos abortamentos ou para nascimento de concepto anormal. Nos casos em que o exame citogenético do feto abortado é normal, devem ser consideradas outras causas, como, por exemplo, mutações gênicas. O exame clínico dos pais e de outros filhos do casal deve ser realizado para investigação de sinais clínicos que podem indicar espectro fenotípico de síndromes. Agentes teratogênicos também podem fazer parte da etiologia da perda fetal. Portanto, a exposição a fatores físicos, químicos e biológicos durante o período da embriogênese deve ser investigada. O objetivo deste trabalho é detectar causas genéticas da perda fetal durante o primeiro trimestre de formação, uma vez que é durante esse período que a perda fetal é mais frequente. Anomalias genéticas graves impedem o desenvolvimento do concepto, culminando em aborto espontâneo precoce. A pesquisa envolverá a análise citogenética de tecido fetal proveniente de vilosidades coriônicas. Esse material será obtido de pacientes do Hospital Maternidade Santa Isabel que forem internadas por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) devido a processo de abortamento espontâneo de primeiro trimestre e que tiverem interesse em participar do projeto. Resultados que revelarem anomalias cromossômicas estruturais indicarão exame citogenético de sangue periférico dos pais. Todas as avaliações citogenéticas (tecido fetal e sangue) envolverão técnicas convencionais, de bandamento C, G, NOR e de alta resolução. Casos que gerarem dúvidas quanto à anomalia cromossômica estrutural serão enviados para outros centros de pesquisa nos quais já haja estabelecimento de métodos mais sofisticados, como a de hibridização *in situ* (Fish). Todos os casais receberão aconselhamento genético que informará sobre diagnóstico, prognóstico e riscos de recorrência de novos abortamentos ou de nascimento de criança malformada. Trabalhos com esse enfoque são muito escassos no Brasil, as referências que se têm são, em sua grande maioria, de pesquisas internacionais. O conhecimento sobre a etiologia da perda fetal é extremamente limitado e os aspectos genéticos são negligenciados devido, principalmente, à falta de informação da classe médica.

251

Desenvolvimento e avaliação de novos vetores para terapia gênica do câncer e doenças degenerativas

Sérgio Ulhoa Dani
 Centro de Terapia Gênica
 Associação dos Amigos dos Portadores
 de Distrofia Muscular (AADM)
 Processo 1997/06229-5
 Vigência: 1/1/1998 a 31/3/2002

Novos vetores de transferência gênica, incorporando as regiões ITR do genoma do vírus adeno-associado, encapsulados em lipossomos, e vetores plasmidiais, encapsulados em mitocôndrias, serão desenvolvidos, para se estudar a eficiência da transferência gênica, a estabilidade dos transgenes e o seu efeito sobre a expressão gênica global em modelos de reposição gênica nuclear (genes p53, p21, kai1 e gene da distrofina) e citoplasmática (reposição de DNA mitocondrial e do gene-repórter LacZ no citoplasma por meio da administração de DNA encapsulado em mitocôndrias ao cérebro, músculo-esqueleto e células neoplásicas), e em um modelo de marcação gênica usando os genes HSV-tk e neoR.

252

Mecanismos envolvidos na gênese dos rearranjos do DNA mitocondrial

Célia Harumi Tengan
 Escola Paulista de Medicina
 Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)
 Processo 1997/06160-5
 Vigência: 1/10/1997 a 30/11/2001

A principal alteração detectada em pacientes com uma doença mitocondrial é a deleção do DNAm_t. A gênese desse rearranjo ainda não está esclarecida. Acredita-se que seja originada de recombinação anômala durante a replicação, favorecida por repetições diretas ou outras alterações, como sequências palindrômicas, genes de RNAt, alterações conformacionais por alta tensão helicoidal e radicais livres. Devido ao aparecimento de dois rearranjos (duplicação e deleção) num mesmo paciente, foi sugerido que o DNAm_t duplicado seria um precursor do DNAm_t deletado. No entanto, a real frequência da duplicação em pacientes com deleção do DNAm_t ainda não está definida. As deleções podem ser encontradas, também, no envelhecimento normal, e sugere-se que seu aparecimento esteja relacionado à lesão por radicais livres provenientes da cadeia respiratória mitocondrial. Porém, em estudo anterior, verificou-se que pacientes com deficiência na cadeia respiratória, que teoricamente geraria mais radicais livres, não acumulam essa deleção de forma mais acelerada. O objetivo deste projeto é tentar elucidar os mecanismos envolvidos na gênese dos rearranjos do DNAm_t. Na primeira parte do trabalho, será analisada a presença de duplicação em pacientes com deleções do DNAm_t por meio de *Southern blotting* e sequenciamento, e será realizada correlação genotípico-fenotípica. Na se-

gunda parte, se tentará melhorar a técnica do PCR longo para o diagnóstico de deleções do DNAmT em pacientes, o que facilitará o diagnóstico devido à facilidade técnica, à rapidez e não à necessidade de material radioativo. Na terceira parte, pretende-se verificar se pacientes com defeito na fosforilação oxidativa apresentam maior produção de radicais livres por meio de imunistoquímica e *Western blot* de material proveniente de músculo, utilizando-se anticorpos contra SOD (Superoxido Dismutase) e NOS (Nitric Oxide Synthase). Na quarta parte, será verificado o cérebro de ratos epiléticos (modelo experimental da pilocarpina) que apresentem aumento de SOD e NOS na fase aguda. Será analisada a presença de deleções do DNAmT (uma deleção específica pelo método quantitativo de diluições de múltiplas deleções pelo método de PCR longo) e proteínas mitocondriais (COX II e COX IV) por meio de imunistoquímica e *Western blot*. Este estudo será realizado na fase crônica do modelo, ou seja, após três meses de indução do status epilético. Os resultados deste projeto poderão contribuir para o conhecimento da relação entre a duplicação e deleção do DNAmT, simplificar o diagnóstico das deleções do DNAmT e verificar se as deleções do DNAmT no envelhecimento realmente estão associadas com a lesão oxidativa.

253

Desenvolvimento de um modelo animal para a síndrome de Marfan por meio da manipulação do genoma do camundongo

Lygia da Veiga Pereira
Instituto de Biociências
Universidade de São Paulo (USP)
Processo 1996/09031-9
Vigência: 1/4/1997 a 31/3/2002

A síndrome de Marfan (SMF) é a mais comum das doenças de tecido conjuntivo, afetando os sistemas ósseo, cardiovascular e ocular, e é causada por mutações no gene FBN1. Este gene codifica a fibrilina, componente das microfibras, largamente distribuídas pelo organismo e associadas à elastina nas fibras elásticas. Estudos iniciais indicam a grande importância da fibrilina na manutenção da integridade dos tecidos. A proposta é a criação de mutações no gene FBN1 em camundongos, gerando assim: 1) um modelo animal para a SMF; 2) um sistema *in vivo* para o estudo da contribuição da fibrilina na formação da fibra elástica e na manutenção da integridade de tecidos.

254

A relação da africanização com os índices de infestação pelo ácaro *Varroa jacobsoni* nas populações de abelhas africanizadas e europeias na zona de transição (paralelos 30° – 35° Sul)

Márcia Regina Cavichio Issa

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo (USP)

Processo 1996/05422-3

Vigência: 1/1/1997 a 30/6/2001

O presente trabalho visa relacionar a variação do índice de infestação e reprodução do ácaro *Varroa* (que mede ação da varroatose) com a dinâmica do processo de africanização em populações de abelhas coletadas entre os paralelos 30° e 35° Sul (onde estão o sul do Rio Grande do Sul, Uruguai e parte da Argentina). Entre esses paralelos formou-se uma zona de transição, onde os grupos raciais de abelhas estão distribuídos de tal maneira que há uma faixa de abelhas completamente africanizadas, uma faixa com abelhas africanizadas e europeias e uma terceira faixa com abelhas apresentando apenas genes europeus. Serão analisados apiários em que não é feito controle químico. Também serão consideradas colmeias tratadas com acaricidas de dois apiários por região. A caracterização genética das populações de abelhas será feita por análise da variabilidade isoenzimática (Mdh e Hk), análise de sítios de restrição, amplificação de sequências específicas de DNA (PCR) e morfometria. Com essa comparação pretendemos: 1) avaliar se o processo evolutivo, que ocorreu nas regiões tropicais e subtropicais, pode atualmente estar ocorrendo em regiões temperadas; 2) avaliar a influência do processo de africanização na resistência da abelha *Apis mellifera* ao ácaro *Varroa jacobsoni*; 3) analisar se as características de resistência das abelhas africanizadas estão sendo introduzidas nas populações de abelhas europeias nessa região de transição e prover informações quanto à sobrevivência das europeias sem o uso de acaricidas; 4) avaliar a dinâmica da infestação em abelhas com DNAs mitocondrial e nuclear de origens diferentes (um de origem africanizada e outro de origem europeia); 5) analisar a influência da varroatose na africanização, comparando abelhas tratadas com não tratadas com acaricidas; 6) avaliar a influência da varroatose na dispersão da abelha africanizada (ao matar europeias, o ácaro libera nichos ecológicos); 7) obter dados para um controle mais efetivo da praga, reduzindo ao mínimo ou mesmo dispensando a necessidade do uso de controles químicos; 8) determinar, após quatro anos seguidos de coleta, se está ocorrendo um processo de adaptação na zona de transição e como esse processo varia conforme a região climática e o tipo de abelha em cada região.

255

Determinação da frequência e das características moleculares das mutações dinâmicas responsáveis por doenças neurodegenerativas

Iscia Teresinha Lopes Cendes