



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA

cafs

DOUTORADO - 2006

Aluno: Alexandre de Paula Rogério

Orientador: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Título: Estudo da atividade antiinflamatória, analgésica, anti-edematogênica e antipirética do extrato de *Lafoensia pacari* e do ácido elágico

Title: Study of anti-inflammatory, analgesic, anti-oedematous, and antipyretic effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid

Resumo: *Lafoensia pacari* é usado na medicina popular para tratar úlceras gástricas e inflamações. Em estudos anteriores, nós demonstramos a atividade antiinflamatória do extrato etanólico de *Lafoensia pacari* na infecção com *Toxocara canis* (um modelo de inflamação eosinofílica sistêmica). O ensaio biomonitorado do extrato etanólico de *L. pacari* no modelo da inflamação eosinofílica aguda, induzida pela injeção intraperitoneal da fração F1 (β -glucana presente nas células das paredes do *Histoplasma capsulatum*), conduziu nos a identificar o ácido elágico como composto ativo que reduz o recrutamento de leucócitos (neutrófilos e eosinófilos) para a cavidade peritoneal. Além de reduzir o recrutamento celular, o ácido elágico e o extrato de *L. pacari* demonstraram significantes atividades anti-edematogênica e analgésica. Embora o extrato de *L. pacari* tenha demonstrado atividade antipirética, o ácido elágico não apresentou esta atividade, sugerindo que a casca da planta contém outros compostos com atividades antipiréticas. A Asma é um processo inflamatório caracterizado por eosinofilia e hiperreatividade aérea (HRA). Células T auxiliares (Th), especificamente do fenótipo Th2, participam na patogênese por liberar citocinas que induzem infiltração de eosinófilos e outras células inflamatórias para o pulmão assim como a HRA. Neste estudo, nós também determinamos a atividade antiinflamatória do extrato de *L. pacari* (200 mg/kg) e ácido elágico (0,1, 1 e 10 mg/kg) na atenuação da inflamação aérea na asma murina. O extrato de *L. pacari* e ácido elágico (1 e 10 mg/kg) reduziram a recrutamento de neutrófilos e eosinófilos e a concentração de uma ou mais citocinas Th2 (IL-4, IL-5 and IL-13) no lavado broncoalveolar, mas não inibiram a síntese de cisteinil-leucotrienos (analisado somente no tratamento terapêutico do dia 18 ao 22) no homogeneizado do pulmão. Além disto, *L. pacari* (200 mg/kg) e ácido elágico (10 mg/kg) falharam em prevenir a HRA induzida pela ovalbumina no tratamento terapêutico de 18 a 22 dias. Nossos resultados demonstram um potente efeito terapêutico de *L. pacari* e ácido elágico estabelecendo novas perspectivas para o desenvolvimento de drogas para tratar dor, edema e inflamação, principalmente inflamações eosinofílicas como na asma.

Summary: *Lafoensia pacari* is used in traditional medicine to treat gastric ulcers and inflammation. In a previous study, we demonstrated the anti-inflammatory effect of the ethanolic extract of *Lafoensia pacari* in *Toxocara canis* infection (a model of systemic eosinophilic inflammation). Bioassay-guided fractionation of the ethanolic extract of *L. pacari* in acute eosinophilic inflammation induced by intraperitoneal injection of fraction 1 (β -glucan present in the cell wall of *Histoplasma capsulatum*) led us to identify ellagic acid as the active compound that reduces recruitment of leucocytes (neutrophils and eosinophils) to the peritoneal cavity. In addition to reducing cell recruitment, ellagic acid and *L. pacari* extract also demonstrated significant anti-oedematous and analgesic properties. Although the *L. pacari* extract demonstrated significant antipyretic effects, ellagic acid did not, suggesting that the plant stem contains other antipyretics. Allergic asthma is an inflammatory process characterized by airway hyper-responsiveness (AHR). By releasing cytokines that induce infiltration of

eosinophils and other inflammatory cells into the airways, often inducing AHR, T helper (Th) cells, specifically Th2 phenotype cells, participate in the pathogenesis of asthma. In this study, we determined the preventive and therapeutic anti-inflammatory effects of *L. pacari* extract (200 mg/kg) and ellagic acid (0.1, 1.0, or 10 mg/kg) on airway inflammation in a murine model of asthma. *L. pacari* and ellagic acid (1 and 10 mg/kg) reduced neutrophil and eosinophil recruitment, as well as reducing the levels of one or more Th2 cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13) in bronchoalveolar lavage fluid, but did not inhibit cysteinyl-leukotriene synthesis in lung homogenates (analyzed only on days 18 to 22 of treatment). In addition, *L. pacari* (200 mg/kg) and ellagic acid (10 mg/kg) both failed to prevent OVA-induced AHR on days 18 to 22 of treatment. Our results demonstrate a potential therapeutic effect of *L. pacari* extract and ellagic acid, providing new prospects for the development of drugs for treating pain, oedema, and inflammation, mainly eosinophilic inflammation such as that seen in asthma patients.

Keywords: *Lafoensia pacari*, ellagic acid, eosinophils, anti-inflammatory, anti-oedematous, analgesic.

Defesa: 28/04/2006

Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli – FCFRP-USP
Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes – FCFRP-USP
Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim – FCFRP-USP
Prof. Dr. Paulo Sergio Pereira - UNAERP
Profa. Dra. Suely Lins Galdino - UFPE

Aluno: Flávia Martinello

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Título: Avaliação da atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Tamarindus indica* L. sobre o metabolismo lipídico e na carcinogênese coloretal em hamster

Title: Evaluation of biologic activity of *Tamarindus indica* L. on lipid metabolism and colorectal carcinogenesis in hamster

Resumo: Os hábitos alimentares têm demonstrado relação com a etiologia e a prevenção da aterosclerose e do câncer. A aterosclerose é a principal causa de doença cardiovascular na população dos países ocidentais e o câncer de cólon é uma das maiores causas de morte por câncer. Os radicais livres podem ter um importante papel no estresse oxidativo relacionado à patogênese destas doenças. Evidências clínicas e experimentais sugerem que a dieta rica em gordura saturada e em carne vermelha aumenta o risco de câncer de cólon e aterosclerose. Estudos epidemiológicos mostram que a ingestão aumentada de frutas e hortaliças ricos em antioxidantes pode proteger contra o desenvolvimento de aterosclerose e vários tipos de câncer. O tamarindo (*Tamarindus indica* L.) é uma fruta consumida principalmente nos países tropicais; da sua semente e pericarpo foram isolados e identificados vários compostos fenólicos com atividade antioxidante, entre eles o flavonóide epicatequina. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito do extrato de tamarindo no metabolismo lipídico e na prevenção da aterosclerose experimental, bem como, o efeito antioxidante na prevenção do câncer de cólon em hamsters. *In vitro*, o extrato de tamarindo e suas frações apresentaram significativas atividades antioxidante e *scavenger* de radicais DPPH (difenilpicrilidrazil), ânion radical superóxido e radical hidroxil. *In vivo*, o extrato diminuiu a concentração sérica de colesterol total, triacilgliceróis e de colesterol não-HDL e aumentou a concentração de colesterol-HDL. O efeito hipolipêmico do extrato foi demonstrado inclusive na artéria aorta, onde observou-se uma redução de lipídios acumulados (células espumosas) na íntima arterial. Além disso, o extrato também inibiu a lipoperoxidação *in vivo* no soro dos animais. Em geral, a lipoperoxidação foi maior nos grupos tratados com colesterol e/ou DMH. A avaliação do perfil enzimático antioxidante do soro, fígado e cólon foi realizada através da determinação da atividade das enzimas GPx, CAT e SOD. A DMH provocou uma redução na atividade destas enzimas nesses locais. O extrato de tamarindo aumentou a atividade de algumas enzimas antioxidantes no soro e provavelmente por isso inibiu a lipoperoxidação sérica. No fígado, o pequeno aumento da atividade das enzimas antioxidantes pelo extrato de tamarindo não foi suficiente para inibir a lipoperoxidação hepática. O extrato de tamarindo e a dieta rica em colesterol não modificaram os níveis de lipoperoxidação e a atividade das enzimas antioxidantes no cólon. A análise histopatológica de cortes do cólon e o índice de marcação de proliferação celular mostraram que isoladamente a dieta rica em colesterol e/ou o extrato de tamarindo não afetaram o cólon. O tratamento com DMH provocou FCAs em todos os animais. O extrato de tamarindo atuou como promotor e potencializou o efeito da DMH nas condições experimentais utilizadas, aumentando a formação de FCAs e a proliferação celular (PCNA) no cólon. No entanto, a dieta rica em colesterol mostrou tendência em proteger o cólon do efeito da DMH, reduzindo o número de FCAs e a proliferação celular.

Summary: Dietary habits have been shown to be related to the etiology and prevention of atherosclerosis and cancer. Atherosclerosis is the main cause of cardiovascular disease in occidental countries. Colon cancer is the second leading cause of cancer death in the world. Free radicals may have an important role on oxidative stress related to the pathogenesis of these diseases. Experimental and clinical evidences suggest that a high saturated fat diet increase colon cancer and atherosclerosis risk. On the other hand, high vegetable and fruit consumption has been associated with a protection against cancer and atherosclerosis development. Tamarind (*Tamarindus indica* L.) is a fruit consumed in tropical countries and four phenolic compounds with antioxidant activities were isolated from its seed, one of them being the flavonoid epicatechin. In this sense, the objectives of this study were to evaluate the effect of tamarind extract on lipid metabolism and atherosclerosis prevention, as well as, the antioxidant effect on experimental cancer colon in hamster. *In vitro*, tamarind extract and

organic fractions showed significant antioxidant and scavenger activity against diphenilpicrilhydrazil (DPPH), superoxide and hidroxil radicals. *In vivo*, the extract decreased significantly total cholesterol, triglycerides and non-HDL levels and increased HDL cholesterol. In the aortic arch a reduction on lipid accumulation (foam **xii** cells) was observed in arterial wall. In addition, the extract also inhibited the lipoperoxidation *in vivo* in animals' serum. Lipoperoxidation was higher in cholesterol treated groups. The evaluation on serum enzymic antioxidant profile was determined through antioxidant enzymes activity GPx, CAT and SOD. Tamarind extract increased the activity of some antioxidant enzymes in the serum, which probably inhibited the serum lipoperoxidation. In the liver, the short increase on activity of antioxidant was unable to inhibit the hepatic lipoperoxidation. The tamarind extract and/or cholesterol diet did not modify the lipoperoxidation and activity of antioxidant enzymes in the colon. Results about the effect of tamarind extract and cholesterol diet on aberrant cript foci DMH induced are abolished because they are in preparation to publication. Brieflly, it will be available.

Defesa: 20/02/2006

Comissão: Prof. Dr. Sergio Akira Uyemura – FCFRP-USP
Prof. Dr. Sérgio Zucoloto - FMRP-USP
Prof. Dr. Sergio Britto Garcia - FMRP-USP
Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata - FCF-USP
Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim – FCFRP-USP

Aluno: Frederico Marianetti Soriani

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Título: Caracterização de uma cálcio ATPase PMR1 de *Aspergillus fumigatus*

Title: Characterization of an *Aspergillus fumigatus* PMR1 calcium ATPase

Resumo: Os conhecimentos sobre a regulação dos níveis de cálcio e manganês no *Aspergillus fumigatus* são bastante limitados, sendo que a homeostase destes íons pode ser diretamente controlada pela ação de ATPases específicas, dentre elas as cálcio ATPases da subfamília PMR1. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi a expressão, caracterização e validação como alvo quimioterapêutico do gene *Afpmr1* de *A. fumigatus*. Inicialmente, foi realizada a complementação funcional, de uma cepa de *S. cerevisiae* nocaute para a PMR1, em meios de cultura suplementados com EGTA ou manganês, revertendo o fenótipo da cepa nocute. Além disto, após expressão do gene *Afpmr1*, foi verificada uma reversão na intensa distribuição de quitina na parede celular da cepa nocaute. Paralelamente, para a RNAi, um fragmento do gene *Afpmr1* apresentando baixa identidade com outros genes de cálcio ATPases de diferentes espécies foi clonado em vetor de expressão em *A. fumigatus* (pALB1). Após indução da expressão, a construção de RNA dupla fita para RNAi silenciou tanto o gene *alb1* isoladamente (clone controle), quanto o duplo silenciamento com o gene de interesse *Afpmr1*, conferindo à ambas construções coloração branca às colônias. Uma vez confirmado o silenciamento gênico, por técnicas de RT-PCR quantitativo, os clones selecionados foram utilizados em ensaios de fagocitose e *killing* de macrófagos. O clone com o gene *Afpmr1* silenciado apresentou diminuição na porcentagem de fagocitose, no número médio de conídios fagocitados e na eficiência de eliminação destes conídios quando comparados com seus controles. Estes resultados mostram que o gene *Afpmr1* pode ser expresso funcionalmente em sistemas heterólogos e seu silenciamento, em *A. fumigatus*, influencia processos celulares que podem estar relacionados à manutenção da estrutura e composição da parede celular, além de desencadear alterações na fagocitose e *killing* de macrófagos

Summary: The knowledge about the regulation of *Aspergillus fumigatus* calcium and manganese levels are very limited, while these ions homeostasis could be directly controlled by the function of specific ATPases, like the PMR1 calcium ATPase. In this way, the aim of the present work was the expression, characterization e validation, as chemotherapeutic target, of the *A. fumigatus Afpmr1* gene. Initially, the functional complementation of a PMR1 knock-out strain phenotype was analyzed in EGTA or manganese supplemented culture media. Besides, after *Afpmr1* expression, an intense distribution of chitin through the cell wall of the knock-out strain was reversed. At the same time, a fragment of the *Afpmr1* gene, showing low identity values for another calcium ATPase genes, was cloned in an *A. fumigatus* expression vector (pALB1) for RNAi. After the induction of gene expression, a double strand RNA construct for RNAi has properly silenced either the *alb1* gene alone (control clone), or the double silencing with the gene of interest *Afpmr1*, leading to both constructions white colored colonies. After confirmation of the gene silencing by quantitative RT-PCR techniques, the selected clones were used in macrophages killing and phagocytosis assays. The *Afpmr1* silenced clone showed a decrease in the phagocytosis percentage, in the mean number of internalized conidia and in the killing percentage when compared with control groups. These results show that the *Afpmr1* gene can be functionally expressed in eukaryotic heterologous systems and its silencing, in *A. fumigatus*, alters cellular processes that can be related with the maintenance of the cell wall structure and composition, as well as promote alterations in the macrophages phagocytosis and killing.

Defesa: 05/09/2006

Comissão: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura - FCFRP-USP
Prof. Dra. Lucia Helena Faccioli - FCFRP-USP

Profa. Dra. Claudia Maria Leite Maffei - FMRP-USP
Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira - FMRP-USP
Prof. Dr. João Atílio Jorge - FFCLRP-USP

Aluno: Lucia de Paula

Orientador: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Título: Comparação de diferentes sistemas de liberação da vacina DNA-hsp65 na indução de proteção contra tuberculose em cobaias

Title: Comparison of different systems of release of the DNA-hsp65 vaccine in the induction of protection against tuberculosis in guinea pigs

Resumo: As grandes mudanças para os pesquisadores da área de vacinas são a otimização das vacinas de DNA para uso em humanos ou animais de grande porte e criar vacinas efetivas de uma única dose usando sistemas de liberação controlada apropriados. O plasmídeo de DNA codificando a proteína de *heat-shock* 65 (hsp65) (DNA-hsp65) foi capaz de induzir resposta imune protetora e terapêutica no modelo murino da tuberculose (TB). Apesar do sucesso da vacina baseada na DNA-hsp65 em solução para proteger camundongos contra TB, esta requer múltiplas doses de grande quantidade de DNA para imunização efetiva. No intuito de otimizar esta vacina e simplificar o protocolo de vacinação, nós co-encapsulamos DNA-hsp65 e o adjuvante dimicolato de trealose (DMT) em microesferas biodegradáveis de ácido polilático-poliglicólico (PLGA) para uma única administração. Além disso, foi também desenvolvida uma formulação *prime-boost* da vacina de dose única baseada na mistura de duas diferentes microesferas de PLGA, apresentando liberação rápida e lenta, de DNA-hsp65 e proteína hsp65 recombinante, respectivamente. Essas formulações foram testadas em cobaias pela comparação da eficácia protetora (componentes efetores da imunidade protetora) e toxicidade (componentes efetores da patologia) induzida pela preparação da preparação do DNA em solução ou BCG. A formulação de dose única *prime-boost* nitidamente apresentou maior eficácia e reduziu a patologia nos pulmões de cobaias.

Summary: The knowledge about the regulation of *Aspergillus fumigatus* calcium and manganese levels are very limited, while these ions homeostasis could be directly controlled by the function of specific ATPases, like the PMR1 calcium ATPase. In this way, the aim of the present work was the expression, characterization e validation, as chemotherapeutic target, of the *A. fumigatus Afpmr1* gene. Initially, the functional complementation of a PMR1 knock-out strain phenotype was analyzed in EGTA or manganese supplemented culture media. Besides, after *Afpmr1* expression, an intense distribution of chitin through the cell wall of the knock-out strain was reversed. At the same time, a fragment of the *Afpmr1* gene, showing low identity values for another calcium ATPase genes, was cloned in an *A. fumigatus* expression vector (pALB1) for RNAi. After the induction of gene expression, a double strand RNA construct for RNAi has properly silenced either the *alb1* gene alone (control clone), or the double silencing with the gene of interest *Afpmr1*, leading to both constructions white colored colonies. After confirmation of the gene silencing by quantitative RT-PCR techniques, the selected clones were used in macrophages killing and phagocytosis assays. The *Afpmr1* silenced clone showed a decrease in the phagocytosis percentage, in the mean number of internalized conidia and in the killing percentage when compared with control groups. These results show that the *Afpmr1* gene can be functionally expressed in eukaryotic heterologous systems and its silencing, in *A. fumigatus*, alters cellular processes that can be related with the maintenance of the cell wall structure and composition, as well as promote alterations in the macrophages phagocytosis and killing.

Defesa: 03/07/2006

Comissão: Profa. Dra. Lucia Helena Faccioli – FCFRP-USP
Prof. Dr. Antonio Ruffino Netto – FMRP-USP
Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi – FCFRP-USP
Prof. Dr. Auro Nomizo – FCFRP-USP
Profa. Dra. Alexandrina Sartori – UNESP-BOTUCATU

