



DOUTORADO – 2008

Aluno: Daniel Roberto Calejjon

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Defesa: 06/06/2008

Título: Estudo da interação de galectina-1 e mastócitos

Title: Study of the interaction between Gal-1 and mast cell

Resumo: A galectina-1 (Gal-1) pertence à uma família de proteínas ligantes de β -galactosídeos e participa de vários processos biológicos, tais como a modulação da resposta inflamatória. Os mastócitos desempenham um importante papel em eventos inflamatórios e alérgicos. Entretanto, o impacto da Gal-1 na biologia dos mastócitos é pouco conhecido. Neste trabalho, foram analisados os aspectos morfológicos e funcionais de células RBL-2H3 tratadas com Gal-1. Além disso, foi investigado o efeito da ausência de Gal-1 endógena sobre a desgranulação in vivo. A avaliação da interação de Gal-1 Texas-Red com células RBL-2H3, por citometria de fluxo, indicou que esta lectina ligou-se às superfícies dessas células de modo dose-dependente. A Gal-1 foi capaz de promover a exposição de fosfatidilserina (FS, um marcador de apoptose) nas superfícies dessas células por meio de reconhecimento de carboidratos. Entretanto, as células RBL-2H3 tratadas com Gal-1 não apresentaram apoptose e/ou necrose, como indicado pelos resultados obtidos dos ensaios de TUNEL, DNA laddering, hipodiploidia, citotoxicidade e microscopia eletrônica de transmissão. As análises de microscopia eletrônica de varredura e Differential Interference Contrast (DIC) de células tratadas com Gal-1 (10 μ M-1 hora) indicaram que essa lectina induziu ondulações apenas nas porções apicais das membranas plasmáticas de células RBL-2H3. Além disso, a Gal-1 modulou negativamente a formação de ondulações nas superfícies de células RBL-2H3 estimuladas via Fc γ RI. A distribuição de componentes de Lipid Rafts relacionados ao processo de ativação celular via Fc γ RI (Lyn, LAT e GD1b) foi modificada pelo tratamento dessas células com Gal-1 (10 μ M), por 1 hora. As células RBL-2H3 tratadas com Gal-1 (10 μ M-45 minutos) apresentaram níveis de liberação da enzima β -hexosaminidase (β -HEX) semelhantes ao do controle negativo, sugerindo que essa lectina não promove a desgranulação de células RBL-2H3. Por outro lado, a Gal-1 inibiu a desgranulação de células RBL-2H3 ativadas via Fc γ RI. O valor máximo de inibição (80%) da liberação de β -HEX foi atingido quando as células foram tratadas com 10 μ M de Gal-1 por 24 horas. Este efeito inibitório não foi detectado quando as células foram tratadas com Gal-1 na presença de β -D-Tiogalactopiranosídeo (TDG), quando estimuladas com ionóforo de cálcio ou tratadas com a forma monomérica da Gal-1. Os dados de microscopia confocal mostraram que os grânulos secretórios de células submetidas ao procedimento de estimulação via Fc γ RI, foram fracamente marcados com o anticorpo AD1 e apresentaram uma distribuição citoplasmática difusa. Entretanto, células tratadas com Gal-1 (10 μ M - 24 horas) e estimuladas via Fc γ RI foram intensamente marcadas com anticorpo AD1 e mostraram um padrão perinuclear, como detectado em células não estimuladas. De modo interessante, camundongos deficientes para o gene de Gal-1 quando submetidos ao ensaio de anafilaxia passiva cutânea (PCA) apresentaram uma reação significativamente maior que os animais selvagens. Com base no conjunto de resultados obtidos sugere-se que a Gal-1 pode participar da homeostase de mastócitos sem provocar apoptose e/ou necrose dessas células. Além disso, a Gal-1 pode modular o processo de exocitose de mastócitos por meio das propriedades lectínica e de dimerização dessa proteína e esse efeito modulatório parece

estar associado a eventos de sinalização celular anteriores ao influxo de cálcio.

Summary: Galectin-1 (Gal-1) belongs to a family of β -galactoside-binding proteins and is involved in several biological processes, including modulation of the inflammatory response. Mast cells play a critical role in allergic and inflammatory events, however, little is known about the impact of Gal-1 on mast cell biology. In this study, we examined the role of Gal-1 in mast cell function using RBL-2H3 (Rat Basophilic Leukemia) and galectin-1 deficient mice. We report that Gal-1 recognized glycoconjugates on mast cells and this interaction promotes phosphatidylserine (PS) exposure in the absence of cell death or apoptosis. Morphological analysis of Gal-1-treated RBL-2H3 cells, by scanning electron microscopy and Differential Interference Contrast (DIC), indicated that Gal-1 induces modifications on cell membranes and modulation of ruffles formation on cell surface of stimulated RBL-2H3 cells. Interestingly, Gal-1 treatment of RBL-2H3 cells, with or without stimulation, promotes alterations in the distribution of the components (Lyn, LAT and GD1b) of Lipid Rafts. Gal-1 did not promote degranulation on RBL-2H3 with or without prior sensitization with IgE. However, Gal-1 treatment inhibits the cell degranulation mediated by $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ and this effect was time and dose-dependent. Also, this inhibition was related to carbohydrate recognition domain and required Gal-1 dimerization. Importantly, confocal microscopy analysis showed that Gal-1 was distributed in cytoplasm close to secretory granules stained AD-1 antibody on RBL-2H3 with or without prior stimulation with $\text{Fc}\gamma\text{RI}$. In addition, we found significantly increased passive cutaneous anaphylaxis reaction in Gal-1 deficient mice. The results demonstrated that Gal-1 may participate of homeostasis and exocytose in mast cells suggesting that Gal-1 can have important role in allergic and inflammatory process.

Comissão: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi
Prof. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira
Prof. Dra. Glória Emília Petto de Souza
Prof. Dr. Constance Oliver
Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

Aluno: **Iêda Maria Martinez Paino**

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria de Souza

Defesa: 27/11/2008

Título: Status férrico e algumas funções do estresse oxidativo de fagócitos em idosos anêmicos ou não, portadores de doenças inflamatórias crônicas

Title: Iron status and some phagocytes oxidative stress functions in the elderly with or without anemia, carriers of inflammation chronic diseases.

Resumo: A Anemia das Doenças Crônicas (ADC) é uma desordem comum em idosos, freqüentemente multifatorial, e exacerbada por citocinas pró-inflamatórias. Nesta população, o diagnóstico de anemia por deficiência de ferro (ADF) é difícil utilizando-se os testes laboratoriais convencionais, devido à prevalência destes estados crônicos. Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas por fagócitos durante o *burst* oxidativo em defesa do hospedeiro, mas são também implicadas como agentes deletérios em um grande número de desordens inflamatórias. **Objetivos.** Verificar a eficiência do receptor de transferrina sérico (sTfR) e índice sTfR-log ferritina (sTfR-F) no diagnóstico da ADF e ADC; determinar os efeitos das anemias e de estados inflamatórios crônicos sem anemia no *burst* oxidativo, fagocitose, produção de óxido nítrico (\bullet NO) por monócitos, e produção de ácido hipocloroso (HOCl) por neutrófilos. **Métodos.** Participaram do estudo cinqüenta e três indivíduos (42 mulheres e 11 homens) idosos recrutados do departamento de Cardio-Geriatria da Rede Pública de Saúde de Ribeirão Preto-SP. A proteína C reativa (PCR), utilizada como marcador inflamatório foi analisada pela metodologia ultra-sensível. O status férrico foi estabelecido pelos níveis do sTfR (enzimaimunoensaio, kit *Quantikine soluble transferrin receptor*, R&D Systems, USA), ferritina sérica (ensaio quimioluminescente, kit *Ferritin Immulite*[®]- DPC, England) e índice sTfR-F. Foram compostos os seguintes grupos, com base nos valores de normalidade dos parâmetros PCR, concentração de hemoglobina, ferritina e sTfR: controle (n=15), ADC (n=12), inflamação (n=08), anemia inexplicável (n=06) e grupo ADF (n=12). Nenhum paciente apresentou função renal prejudicada, hemoglobinopatias, diabetes *mellitus* descompensada, doenças infecciosas ou malignas. Estudou-se o efeito da ADC, ADF, anemia inexplicável e inflamação no *burst* oxidativo, fagocitose de neutrófilos e monócitos por citometria de fluxo, produção de HOCl por neutrófilos purificados e de \bullet NO produzido em cultura de monócitos em meio RPMI 1640, estimulados por lipopolissacáride (LPS). **Resultados.** Os níveis de sTfR foram capazes de diagnosticar ADF em sete (58,34%) dos doze pacientes do grupo ADF. A intensidade de fluorescência (IF) do *burst* oxidativo de neutrófilos, que reflete a atividade celular, no grupo ADF foi significativamente menor que a do grupo controle ($p < 0,05$), mas a IF de monócitos não foi estatisticamente diferente. As percentagens de monócitos e neutrófilos realizando *burst* oxidativo e fagocitose dos grupos ADF, anemia inexplicável e inflamação não foram estatisticamente diferentes do grupo controle. As percentagens de monócitos e neutrófilos realizando fagocitose do grupo ADC foram estatisticamente maiores que as do grupo controle ($p < 0,05$). A produção de HOCl nos grupos ADC e inflamação foram estatisticamente menores comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$), enquanto houve uma superprodução de \bullet NO por monócitos no grupo ADC ($p < 0,05$). **Conclusão.** No presente estudo, o sTfR foi uma ferramenta diagnóstica adicional à ferritina no diagnóstico da ADF, mas o valor do índice sTfR-F não aumentou a utilidade diagnóstica do sTfR em indivíduos idosos. \bullet NO parece modular a produção de HOCl, provavelmente por regular a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO). Estes resultados mostraram o papel importante do ferro na ADC e ADF em manter a resposta imunológica de fagócitos durante o processo de envelhecimento.

Summary: Anemia of Chronic Disease (ACD) is a very common disorder in elderly and it is often multifactorial, exacerbated by pro-inflammatory cytokines. In these people, the diagnostic of iron deficiency anemia (IDA) or iron deficiency is difficult in these patients using the conventional iron status tests, because of the prevalence of these chronic states. Reactive oxygen species (ROS) are produced by phagocytic cells during the oxidative burst in defense of the host, but it has also been implicated as a very harmful agent in an increasing number

of inflammatory-mediated disorders. **Objectives:** to elucidate the use of serum transferrin receptor (sTfR) and sTfR-log ferritin index (TfR-F index) to diagnose IDA and ACD; to determinate the effects of anemia and chronic inflammatory states without anemia in some function of oxidative stress, such as oxidative burst, phagocytosis, nitric oxide (\bullet NO) production by monocytes and the hypochlorous acid (HOCl) production by purified neutrophils. **Methods:** Fifty three (42 women and 11 men) elderly subjects recruited from geriatric department of healthy public system of Ribeirão Preto city were selected. The high sensitivity C-Reactive Protein (CRP) was analyzed as an inflammatory marker. The iron status was confirmed by sTfR (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, kit Quantikine soluble transferrin receptor R&D Systems, USA), serum ferritin levels (chemiluminescence assay, kit Ferritin Immulite[®] - DPC, England) and TfR-F index. The groups were established according to the criteria CRP assay, hemoglobin analysis, ferritin and sTfR: control (n =15), ACD (n =12), inflammation (n =08), unexplained anemia (n=06), and IDA (n=12). Patients with impaired kidney function, hemoglobinopathy, decompensate diabetes *mellitus* or infectious and malignancies diseases were excluded. We also studied the effect of ACD, IDA, unexplained anemia and inflammation on oxidative burst, phagocytosis of neutrophils and monocytes by flow cytometry and HOCl generation of neutrophils and \bullet NO produced by the monocytic cell culture, cultured in RPMI 1640 medium, stimulated by lipopolysaccharide (LPS). **Results:** Our results showed that sTfR could diagnose IDA in seven (58.34%) of twelve patients in IDA group. Oxidative burst fluorescence intensity of neutrophil in IDA group was lower statistically compared to control group, $p < 0.05$. Oxidative burst fluorescence intensity of monocytes did not differ significantly. The percentages of monocytes and neutrophils expressing oxidative burst and the phagocytosis did not differ significantly amongst control, IDA, unexplained anemia and inflammatory groups. However, the percentages of neutrophils and monocytes expressing phagocytosis in ACD group were statistically higher when compared to control group ($p < 0.05$). The HOCl generation in ACD, and inflammation groups were lower significant statistically than control group, $p < 0.05$, while there was an overproduction of \bullet NO by monocyte in ACD group ($p < 0.05$). **Conclusion:** In the present study, the sTfR was an additional diagnostic tool to ferritin for the diagnosis of IDA, but the value of the sTfR-F index did not increase the utility diagnostic of sTfR in elderly patients. \bullet NO seems modulate the HOCl production, perhaps by regulates the myeloperoxidase (MPO) enzyme activity. These results showed the important role of iron in ACD and IDA to maintaining phagocyte immune defense of organism during the aging process.

Comissão: Profa. Dra. Ana Maria de Souza
Prof. Dr. Amauri Antiquera Leite
Profa. Dra. Maria Regina Torqueti
Prof. Dr. Luiz Marcos da Fonseca
Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott

Aluno: Luciene Andrade da Rocha Minarini

Orientador: Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini

Defesa: 07/04/2008

Título: Estudo dos mecanismos de resistência às quinolonas em enterobactérias isoladas de alguns estados brasileiros

Title: Characterization of the mechanisms of quinolone resistance among enterobacterial isolates from Brazil

Resumo: Este estudo foi elaborado com o objetivo de elucidar os mecanismos de resistência às quinolonas presentes em enterobactérias isoladas de pacientes de duas regiões metropolitanas brasileiras. Foram avaliadas possíveis alterações nas proteínas relacionadas com o sítio de ação das quinolonas, bem como a presença de plasmídeos e integrons que carregam determinantes gênicos que codificam resistência às quinolonas. A associação destes com mecanismos plasmídeos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos também foi analisada. Foram avaliadas 257 enterobactérias resistentes ao ácido nalidíxico isoladas de pacientes hospitalizados e da comunidade no período de 2000 a 2005. Por PCR e seqüenciamento, foram analisadas as mutações presentes nos genes cromossômicos *gyrA* e *parC* e as estruturas gênicas associadas com determinantes plasmídeos de resistência às quinolonas, *Qnr*, e aos β -lactâmicos de amplo espectro. Foram determinados os perfis plasmídeos e a transferibilidade dos plasmídeos que carregam estes determinantes. A extração e a análise das proteínas de membrana externa foi realizada para avaliar uma possível perda ou diminuição da expressão de porinas, também relacionada com os mecanismos de resistência avaliados. Todas as amostras foram resistentes ao ácido nalidíxico, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) superior a 16 $\mu\text{g/mL}$, e em média, 70% apresentaram diminuição de sensibilidade às fluoroquinolonas testadas. De 257 enterobactérias resistentes ao ácido nalidíxico, em seis enterobactérias (2,3%), incluindo 3 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* e 1 *C. freundii* foi encontrado o gene *qnrB*. Cinco linhagens apresentaram suas seqüências idênticas ao gene *qnrB2*, e uma linhagem, *C. freundii* JF79, apresentou uma seqüência idêntica ao gene *qnrB8*. Em uma linhagem de *E. cloacae* foi detectado o gene *qnrA1* (0,37%). Os genes *qnrA* e *qnrB* apresentaram-se localizados em plasmídeos que apresentaram de 55 a 180 kilobases. A análise da estrutura gênica indicou que os genes *qnrA1* e *qnrB2* estavam associados com um integron classe 1 e localizados entre o elemento *ISCR1* e a segunda cópia do segmento conservado 3'. Na coleção bacteriana avaliada, as principais mutações observadas foram nos códons 83 e 87 em *gyrA*, e nos códons 80 e 84 em *parC*. Todas as enterobactérias que exibiram unicamente mutações no gene *gyrA* apresentaram CIM $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ para o ácido nalidíxico. A diferença encontrada nos valores da CIM de fluoroquinolonas em enterobactérias que apresentaram as mesmas substituições em GyrA e ParC foi explicada pela ausência ou diminuição da expressão de porinas. Em relação à produção de β -lactamase de espectro ampliado (ESBL), sua presença foi comprovada em 24 (9,3%) enterobactérias. O seqüenciamento de *bla*_{CTX-M} identificou 18 determinantes: CTX-M-2 (n=13), incluindo dois novos variantes, CTX-M-8 (n=2) e CTX-M-9 (n=3) mediados por plasmídeos de 48 a 180 kilobases, não conjugativos, em maioria. O gene *bla*_{SHV-5} foi detectado em seis enterobactérias. Todos os determinantes do grupo 2 apresentaram-se associados com um elemento *ISCR1*, enquanto que aqueles do grupo 9 estiveram relacionados com *ISEcp1*. Concluindo, o principal mecanismo de resistência às quinolonas detectado foi a presença de substituições em GyrA e ParC, apesar de outros mecanismos, como a diminuição da expressão de porinas estarem envolvidos nas enterobactérias avaliadas. A associação da produção de ESBL foi significativa devido ao encontro de uma grande diversidade de genótipos circulando na comunidade, com uma predominância de enterobactérias produtoras de CTX-M. Quanto aos determinantes *Qnr* descritos neste estudo, que notoriamente foram os primeiros relatos no Brasil, somente dois deles apresentaram-se relacionados com a produção de ESBL.

Summary: The aim of this study was to investigate the main mechanisms of quinolone resistance among enterobacterial isolates recovered from hospitalized patients and outpatients in Brazil.

The modification of the quinolone targets with changes of DNA gyrase and of topoisomerase IV genes and the presence of determinants codifying plasmid-mediated quinolone and oxymino-cephalosporins resistance were investigated. Two hundred fifty seven non-duplicate nalidixic-acid resistant enterobacterial isolates recovered from January 2000 to May 2005 were analysed. Mutations in the topoisomerases *gyrA* and *parC* genes and the genetic structures surrounding Qnr and CTX-M determinants were recognized by PCR and sequencing. Conjugation experiments were performed to determine whether the *qnr*- and *bla*_{CTX-M} carrying plasmids were self transferable. Also, decrease in the level of porin expression related to quinolone resistance was assessed. All enterobacterial isolates were resistant to nalidixic-acid, showing minimal inhibitory concentrations (MIC) $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ and 70% of these isolates showed decreased susceptibility to fluoroquinolone. Six *qnrB*-positive (2.3%) out of 257 nalidixic-acid resistant enterobacterial isolates, were identified, including 3 *Escherichia coli*, 2 *Klebsiella pneumoniae* and 1 *Citrobacter freundii*. Five isolates had an identical *qnrB2* sequence and one isolate, *C. freundii* 79, possessed the *qnrB8*. A single *Enterobacter cloacae* carrying a plasmid encoding *qnrA* gene was identified (0.37%). All isolates were negative for the *qnrS* genes. Plasmid-mediated quinolone resistance ranged from 55- to 180-kb in size. Sequence analysis of the genetic structures surrounding of the *qnrA* and *qnrB* genes identified an *ISCR1* element at the left-hand boundary and a partial copy of the 3'-end segment of class 1 integrons. Concerning the changes of DNA gyrase and topoisomerase IV, the most common modification in the enterobacterial isolates analyzed were present at codons 83 and 87 in GyrA and in ParC at codons 80 and 84. All isolates that exhibited mutations in *gyrA* gene showed nalidixic-acid MIC $\geq 16 \mu\text{g/mL}$. The finding of different MIC values to fluoroquinolones in enterobacterial isolates with the same GyrA and ParC modification was explained by a decreasing in the level of porin expression. Regarding β -lactam resistance mechanisms, twenty four (9.3%) ESBL-producing enterobacterial isolates were detected. Sequencing of the CTX-M-encoding genes identified 18 determinants belonging to CTX-M-2 (n=13), CTX-M-8 (n=2) and CTX-M-9 (n=3) groups. CTX-M-2 group determinants included *bla*_{CTX-M-2} and the two novel variants. Plasmids harboring *bla*_{CTX-M} genes ranged from 48- to 180- kb in size and were not transferable, in their majority. The *bla*_{SHV-5} genes were detected in all the 6 *bla*_{CTX-M} negative isolates. All alleles belonging to the group 2 were associated with *ISCR1* element, while all *bla*_{CTX-M-9} genes were related to *ISEcp1* element. In conclusion, alterations in the targets of quinolones, GyrA and ParC was the main mechanism of quinolone resistance identified in this study, although a decreasing of the porins expression had been identified among nalidixic-acid resistant enterobacterial isolates. In the surveyed area, the prevalence of ESBL producers was important (9.3%), provided that this finding was related to a large diversity of genotypes circulating in the community, mainly CTX-M-producing isolates. This study constituted the first epidemiological survey of QnrA and QnrB determinants among Brazilian isolates. Interestingly, the *qnrB2* gene was identified in non ESBL producers isolates and *qnrS* genes were not found

Comissão: Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini
Profa. Dra. Elizabeth de Andrade Marques
Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman
Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
Prof. Dr. Roberto Martinez

Aluno: Rafael Chacon Ruiz Martinez

Orientador: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Defesa: 11/12/2008

Título: Efeito da utilização de culturas lácticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas

Title: Effect of lactic acid probiotic cultures utilization on the vaginal microbiota of women diagnosed with bacterial and fungal infections

Resumo: A microbiota vaginal saudável é constituída, majoritariamente, por espécies de lactobacilos que representam uma barreira natural contra microrganismos causadores de doenças como a candidíase vulvovaginal (CVV), vaginose bacteriana (VB) e infecções do trato urinário (ITU), que juntas acometem cerca de um bilhão de mulheres no mundo anualmente. Um melhor entendimento da ecologia microbiana vaginal pode ser útil na otimização de tratamentos existentes para as infecções urogenitais, os quais podem destruir parcialmente a microbiota autóctone, predispor a novas infecções, contribuir para a seleção de microrganismos resistentes e causar efeitos colaterais indesejáveis. A utilização de microrganismos certificadamente probióticos, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *Lactobacillus reuteri* RC-14, representa uma alternativa terapêutica promissora na abordagem de VB e CVV, uma vez que são capazes de colonizar o trato vaginal, apresentam atividade inibitória frente a diversos patógenos do trato urogenital, exibem risco mínimo para a seleção de microrganismos resistentes e podem auxiliar na restauração da microbiota vaginal. Os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar a prevalência de espécies de lactobacilos na microbiota vaginal de mulheres saudáveis e diagnosticadas com infecções vaginais (CVV e VB) da cidade de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil), (ii) avaliar a capacidade de isolados de lactobacilos produzirem peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e (iii) determinar a eficácia da utilização de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 no tratamento de CVV e VB, quando co-administrados com medicamentos antimicrobianos tradicionais. Participaram deste estudo, 196 pacientes voluntárias, atendidas por médicos ginecologistas de centros de saúde ligados à Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto (64 saudáveis, 68 diagnosticadas com CVV e 64 diagnosticadas com VB) e duas amostras vaginais de cada paciente foram coletadas com o auxílio de zaragatoas esterilizadas. Uma zaragatoa foi utilizada para semeadura em ágar MRS (de Man, Rogosa & Sharpe), os isolados de bactérias lácticas obtidos foram analisados através da técnica de PCR-ARDRA (Reação em cadeia da polimerase – Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado) e a habilidade de *Lactobacillus* spp. produzir H_2O_2 foi determinada semi-quantitativamente. A outra zaragatoa foi utilizada para a análise das espécies de lactobacilos da microbiota vaginal pela técnica independente de cultivo PCR-DGGE (Reação em cadeia da polimerase – Eletroforese em gel de gradiente de desnaturação). As leveduras do gênero *Candida* foram obtidas através da semeadura das amostras vaginais provenientes de pacientes saudáveis e com CVV no meio Chromagar® *Candida* e identificadas através de provas bioquímicas de referência. As pacientes diagnosticadas com CVV participaram de um estudo randomizado, duplo-cego, placebo-controlado e foram tratadas com dose única de fluconazol (150mg) e suplementação diária durante 28 dias com (i) duas cápsulas contendo os microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (Urex-Cap-5®) ou (ii) duas cápsulas de placebo. As pacientes com VB também participaram de um estudo randomizado, duplo-cego, placebo-controlado e foram tratadas com dose única de tinidazol (2g) e suplementação diária com cápsulas do probiótico (Urex-Cap-5®) ou placebo, conforme descrito acima. Todas as pacientes foram reavaliadas ao final do tratamento, no 28º dia. Foram realizados experimentos para averiguar o possível efeito de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 na modulação *in vitro* da infecção por *Candida albicans* em culturas de células epiteliais vaginais humanas (VK2/E6E7) Os resultados mostraram que, pela técnica de PCR-ADRA, *L. crispatus* foi a espécie mais prevalente nos grupos de pacientes saudáveis (37,0%) e com CVV (35,9%), enquanto que *L. gasseri* foi predominante no grupo de pacientes com VB (34,6%). De acordo com o método de PCR-DGGE, *L. iners* foi o microrganismo mais prevalente nos três grupos de pacientes avaliados: saudáveis, com

CVV e VB (48,7%, 44,7% e 65,0%, respectivamente). A maioria dos isolados de *Lactobacillus* spp. obtidos nos grupos de pacientes saudáveis (98,6%) e diagnosticadas com CVV (97,4%) foram capazes de produzir H₂O₂ (1 a 100mg/L), em comparação a apenas 68,2%, determinado no grupo de pacientes com VB ($p < 0,05$). *L. crispatus* e *L. johnsonii* produziram as maiores quantidades médias de H₂O₂ (≥ 30 mg/L). A taxa de colonização por leveduras do gênero *Candida* foi de 26,6% no grupo de pacientes saudáveis (*C. albicans* correspondeu a 52,4% de todos os isolados), enquanto que no grupo de pacientes com CVV, 89,2% dos isolados leveduriformes foram identificados como *C. albicans*. Para as análises estatísticas dos dados obtidos com os testes clínicos, foram consideradas 55 pacientes diagnosticadas com CVV (pela presença de sinais e sintomas da infecção e cultura positiva para *Candida* sp.) e foi observado que a utilização de dose única de fluconazol e suplementação diária com o probiótico, resultou em taxa de cura mais elevada para a infecção (89,7%) em comparação com aquela verificada no grupo placebo (65,4%) ($p < 0,05$). A utilização de tinidazol em associação com a ingestão diária de Urex-Cap-5® no tratamento de pacientes com VB também resultou em taxa de cura mais elevada para a condição (87,5%), em comparação àquela observada no grupo placebo (50,0%) ($p < 0,05$). A atividade anti-*Candida* de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 foi observada através do modelo *in vitro* para infecção vaginal. Em conclusão, quando as técnicas de PCR-ARDRA e PCR-DGGE foram comparadas entre si, foi observado que ambas apresentaram limitações, evidenciando a importância do emprego de diferentes metodologias para avaliação adequada das espécies de lactobacilos presentes na microbiota vaginal. As espécies de lactobacilos vaginais determinadas nas mulheres saudáveis do presente trabalho foram semelhantes àquelas verificadas em estudos prévios descritos na literatura com pacientes com dieta e localização geográfica notadamente distintas. Os dados do presente trabalho sugerem que a presença de lactobacilos produtores de H₂O₂, isoladamente, não confere proteção contra CVV, enquanto que a ausência desses microrganismos pode ser um fator contribuinte para VB. Além disso, foi demonstrado que a utilização de medicamentos antimicrobianos tradicionais e suplementação com os microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 foi mais eficiente no tratamento de CVV e VB em comparação com medicamentos clássicos e placebo. Estes resultados podem contribuir para prolongar a vida útil de medicamentos cuja eficácia pode ser comprometida devido à seleção de microrganismos resistentes e também reduzir o tempo de tratamento para pacientes que necessitam de terapias clássicas por períodos prolongados.

Summary: The vaginal microbiota is mainly constituted by lactobacilli species, which represent a natural barrier against microorganisms that cause vulvovaginal candidiasis (VVC), bacterial vaginosis (BV), and urinary tract infections (UTI). Together, these conditions afflict each year an estimated one billion women worldwide. A better understanding of the vaginal microbial ecology may be useful to improve the current available treatments for urogenital infections, which can partially destroy the autochthonous microbiota, predispose to other infections, contribute for the selection of resistant microorganisms and cause undesirable collateral effects. The use of microorganisms with demonstrated probiotic properties, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14, represents a promising therapeutic alternative for BV and VVC, since they are able to colonize the vaginal tract, present inhibitory against several urogenital pathogens, pose minimal risk for the selection of resistant microorganisms and can help to restore the vaginal microbiota. The objectives of this work were: (i) to evaluate the prevalence of lactobacilli species in the vaginal microbiota of healthy women and those diagnosed with vaginal infections (VVC and BV) in the city of Ribeirão Preto (São Paulo, Brazil), (ii) to evaluate the ability of the lactobacilli isolates to produce hydrogen peroxide (H₂O₂) and (iii) to determine the efficacy of the use of *L. rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 in the treatment of VVC and BV, in co-administration with traditional antimicrobials. 196 voluntary subjects were examined by the gynecologists team from health centers affiliated with Universidade de São Paulo, campus at Ribeirão Preto (64 healthy, 68 diagnosed with VVC and 64 diagnosed with BV) and two vaginal samples from each patient were collected by the use of two sterile swabs. One swab was cultured in MRS (de Man, Rogosa & Sharpe) agar, the isolates of lactic acid bacteria obtained were analyzed by PCR-ARDRA (Polymerase chain reaction - Amplified ribosomal DNA restriction analysis) and the ability of *Lactobacillus* spp. to produce hydrogen peroxide was determined semi-quantitatively. The other swab was used for the analysis of lactobacilli species from the vaginal microbiota using the culture-independent PCR-DGGE (Polymerase

chain reaction – Denaturing gradient gel electrophoresis). The yeasts belonging to *Candida* genus were obtained also by culturing the vaginal material from healthy and VVC patients in Chromagar® *Candida* and were identified by standard biochemical tests. VVC patients were enrolled in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial and treated with a single dose fluconazole (150mg) and daily supplementation for 28 days with (i) two capsules containing the probiotic microorganisms *L. rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 (Urex-Cap-5®) or (ii) two placebo capsules. BV patients were also enrolled in a randomized, double-blind, placebo controlled trial and treated with a single dose of tinidazole (2g) and supplementation with probiotic capsules (Urex-Cap-5®) or placebo, as described above. All patients were re-evaluated at the end of treatment, on the 28th day. Experiments were also conducted to assess the possible effect of *L. rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 in the *in vitro* modulation of vaginal infection by *Candida albicans* on cultures of human vaginal epithelial cells (VK2/E6E7). The results revealed that according to PCR-ADRA, *L. crispatus* was the most prevalent species in the groups of healthy women (37.0%) and those with VVC (35.9%), while *L. gasseri* was dominant in BV patients (34.6%). By PCR-DGGE method, *L. iners* was the most prevalent *Lactobacillus* species in all the three groups evaluated: healthy, VVC and BV (48.7%, 44.7% and 65.0%, respectively). The majority of the isolates of *Lactobacillus* spp. from healthy women (98.6%) and those with VVC (97.4%) were able to produce H₂O₂ (1 to 100mg/L) in comparison with only 68.2% assessed for the BV group ($p < 0.05$). *L. crispatus* and *L. johnsonii* produced the highest average levels of H₂O₂ (≥ 30 mg/L). Colonization rate by yeasts belonging to *Candida* genus was 26.6% in the group of healthy patients (*C. albicans* represented 52.4% of all isolates), whereas in the VVC group, 89.2% of yeast isolates were identified as *C. albicans*. For the performance of statistical analysis of the results obtained with the clinical trials, 55 patients diagnosed with VVC (by the presence of symptoms and signals of the infection and positive culture for *Candida* sp.) were taken into consideration and it was observed that the use of a single dose of fluconazole and daily supplementation with probiotics, yielded a higher cure rate (89.7%), in comparison with the placebo group (65.4%) ($p < 0.05$). The use of tinidazole plus probiotic also resulted in higher cure rate of the infection (87.5%), compared to placebo group (50.0%) ($p < 0.05$). An anti-*Candida* activity of *L. rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 was observed in the *in vitro* model of vaginal infection. In conclusion, when PCR-ARDRA and PCR-DGGE were compared, it was verified that both presented limitations, which evidences the need of using different techniques for a better knowledge of lactobacilli species present in the vaginal microbiota. The lactobacilli species found in healthy women in this work were similar to those reported in previous studies described in the literature for patients with distinctly different diet and geographic localization. The data of the present work indicate that solely the presence of H₂O₂-producing isolates does not render protection against VVC, whereas the absence of those microorganisms may be a contributing factor for BV. Moreover, it was demonstrated that the use of classical medicines supplemented with the probiotics *L. rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 was more efficient to treat VVC and BV in comparison with classical medicines plus placebo. These results may contribute to extend the longevity of drugs whose efficacy is compromised due to the selection of resistant microorganisms and also to shorten the length of treatment courses for patients that require long regimens with standard therapy.

Comissão: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis
Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão
Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad
Profa. Dra. Maria Jose Vieira Fonseca
Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka

Aluno: Reginaldo dos Santos Pedroso

Orientador: Profa. Dra. Regina Celia Candido

Defesa: 04/08/2008

Título: Caracterização molecular, virulência e suscetibilidade ao fluconazol de espécies ambientais de *Cryptococcus*, antes e após inoculação em modelo murino

Title: *Cryptococcus* environmental species: molecular characterization, virulence and susceptibility to fluconazole before and after inoculation in a murine model

Resumo: *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* são as principais espécies do gênero que causam infecção no homem, *C. albidus* e *C. laurentii* são espécies menos envolvidas. O presente trabalho teve por objetivos avaliar a patogenicidade *in vivo*, os fatores e os genes relacionados à virulência, e verificar o perfil de suscetibilidade ao fluconazol de 10 isolados ambientais de cada uma das espécies: *C. neoformans*, *C. albidus* e *C. laurentii*, antes e após a inoculação em camundongos BALB/c imunocompetentes; pesquisar os sorotipos, *mating types* e realizar a tipagem molecular. Proteinase, fosfolipase, urease, produção de melanina e crescimento à 37°C foram pesquisados utilizando metodologias clássicas, e a pesquisa dos genes e determinação dos sorotipos e *mating types* foram feitas por PCR. A tipagem molecular foi realizada por PCR-*fingerprinting*, com os iniciadores (GACA)₄ e M13. A determinação da CIM do fluconazol foi realizada pelo método da microdiluição em caldo. Todos os isolados de *C. neoformans* foram sorotipos A e MAT α . A inoculação em animais mostrou que 9 isolados de *C. neoformans* mataram 100% deles em até 33 dias, e 1 levou os animais à morte num período entre 40 e 82 dias; 9 isolados foram recuperados dos pulmões e cérebro dos animais em 7 e 14 dias, e um deles levou todos os animais à morte em 12 dias, sendo possível recuperá-lo somente no 7º dia. Os animais inoculados com *C. albidus* e *C. laurentii* permaneceram vivos até negativação das culturas dos órgãos avaliados. *C. albidus* foi isolado principalmente do fígado e dos pulmões até 10 dias após a inoculação, *C. laurentii* dos pulmões e do cérebro até 120 dias. Todos os isolados das 3 espécies produziram cápsula antes e após a inoculação. Todos *C. neoformans*, 6 *C. albidus* e 6 *C. laurentii* cresceram à 37°C antes e depois da inoculação. Melanina foi produzida por todos os isolados de *C. neoformans* e nenhum *C. albidus* nas duas ocasiões; e por 6 e 9 isolados de *C. laurentii*, antes e depois da inoculação, respectivamente. Seis isolados de *C. neoformans* e 1 de *C. laurentii* produziram proteinase nas duas ocasiões. Sete isolados de *C. albidus* produziram proteinase antes e todos depois da inoculação. Fosfolipase foi produzida por todos *C. neoformans* e *C. albidus*, e por 6 *C. laurentii* nas duas ocasiões. A avaliação da atividade da urease realizada em meio líquido foi positiva em 24 a 48 horas pelos isolados de *C. neoformans* e *C. laurentii*, e em 24 a 96 horas por *C. albidus*. A CIM de fluconazol variou de 2 a 8 µg/mL para *C. neoformans*, de 8 a ≥ 64 µg/mL para *C. albidus*, e de 1 a 64 µg/mL para *C. laurentii*, nas duas ocasiões. Todos os isolados de *C. neoformans* apresentaram os genes lacase (*Lac1*), fosfolipase (*PLB1*), proteinase (*cnap1*), calcineurina (*CNA1*), urease (*URE1*), e *ERG11*, com os oligonucleotídeos utilizados. A PCR com *ERG11* mostrou uma banda no gel de agarose para todos *C. albidus*, porém nenhum dos outros genes pesquisados foram amplificados em *C. albidus* e *C. laurentii*. A tipagem molecular por PCR-*fingerprinting* dos isolados de *C. neoformans* revelou 2 tipos moleculares: VNI (7 isolados) e VNII (3 isolados). A maioria dos isolados de *C. albidus* apresentou homogeneidade nos padrões de bandas gerados, e *C. laurentii* foi a espécie que demonstrou maior diversidade genética por esta metodologia. Concluímos que a passagem dos isolados pelos animais não alterou os fenótipos estudados e nenhuma alteração foi detectada pela análise molecular. No entanto, verificamos a grande heterogeneidade molecular dos isolados de *C. laurentii* estudados

Summary: Species of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* are the main ones in the genus causing infection in man while *C. albidus* and *C. laurentii* are less involved. This study evaluated the *in vivo* pathogenicity, factors and genes related to virulence and the susceptibility to fluconazole before and after inoculation in immunocompetent BALB/c mice of ten

environmental isolates of *C. neoformans*, *C. albidus* and *C. laurentii*. Serotypes, mating types and molecular typing were also determined to complete the evaluation. Enzymes like proteinases, phospholipase, urease, production of melanin and growth at 37°C were investigated by classical methods, but gene characterization and determination of serotypes and mating types were investigated by PCR. Molecular typing was done by PCR-fingerprinting with primers (GACA)₄ and M13. The microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of fluconazole. All *C. neoformans* isolates were serotype A and MAT/α and 9 of them when inoculated in animals killed 100% in up to 33 days. One isolate inoculated killed the animals in 40 to 82 days. Nine isolates were recovered from the animal lungs and brain in 7 and 14 days and the one which killed all animals in 12 days was only recovered on the 7th day. Animals inoculated with *C. albidus* and *C. laurentii* were alive until the tissue cultures of evaluated organs were negative. *C. albidus* was isolated mainly from the liver and lungs in up to 10 days after inoculation and strains of *C. laurentii* from the lungs and brain in up to 120 days. All isolates in the 3 species were capsule producers before and after inoculation. All strains of *C. neoformans*, 6 *C. albidus* and 6 *C. laurentii* grew at 37°C both before and after inoculation. All *C. neoformans* produced melanin and 6 *C. laurentii* produced it before inoculation and nine after. None was produced by *C. albidus*. Six isolates of *C. neoformans* and one of *C. laurentii* produced proteinases in both situations, before and after inoculation. Seven *C. albidus* isolates produced the protein hydrolyzing enzyme before inoculation and all after. Phospholipase enzyme was produced by all *C. neoformans*, and *C. albidus* and by 6 *C. laurentii* in both conditions, before and after inoculation. Urease activity was detected between 24 and 48 hours after incubation in a liquid medium for *C. neoformans* and *C. laurentii* cultures and after 24 to 96 hours for *C. albidus*. Fluconazole MICs ranged from 2 to 8 µg/ mL for *C. neoformans* isolates, from 8 to ≥ 64 µg/mL for *C. albidus* and from 1 to 64 µg/mL for *C. laurentii* in both conditions. Genes laccase (*Lac1*), phospholipase (*PLB1*) proteinase (*cnap1*), calcineurine (*CNA1*), urease (*URE1*) and *ERG11*, detected with the primers used were present in all *C. neoformans*. With exception of *ERG11*, which showed a band in agarose electrophoresis by all *C. albidus*, the other genes were not amplified in *C. albidus* and *C. laurentii*. Molecular typing by PCR-fingerprinting showed two molecular types in *C. neoformans*: VNI in 7 isolates and VNII in 3 isolates. Most *C. albidus* showed homogenous patterns in the bands generated and *C. laurentii* was the species with the higher genetic diversity by this methodology. It is concluded that isolate inoculations in animals does not alter phenotypes and no alteration is detected by molecular analysis. However, the high molecular heterogeneity of *C. laurentii* was detected

Comissão: Profa. Dra. Regina Celia Candido
Profa. Dra. Alcyone Artioli Machado
Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins
Prof. Dr. Francisco de Assis Baroni

Aluno: Roberto Nicolete

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

Defesa: 29/08/2008

Título: Estudos sobre os efeitos da administração in vivo de microesferas biodegradáveis contendo Leucotrieno B4 ou Prostaglandina E2 em modelo de histoplasmose murina.

Title: Studies about the effects of the in vivo administration of Leukotriene B4 or Prostaglandin E2-loaded biodegradable microspheres on model of murine histoplasmosis.

Resumo: Leucotrienos e prostaglandinas são metabólitos do ácido araquidônico que, além de mediadores da inflamação são importantes imunomoduladores da liberação de citocinas, nas respostas imune inata e adquirida. Embora estes mediadores apresentem potencial para serem utilizados como adjuvantes ou imunomoduladores da resposta imune, eles são altamente instáveis, dificultando o uso in vivo. Por esta razão, estas substâncias foram incorporadas em um sistema polimérico microestruturado. Este foi constituído de microesferas de quatro a seis micrômetros de diâmetro, contendo leucotrieno B4 (LTB4) ou prostaglandina E2 (PGE2) incorporados na matriz polimérica (PLGA). A caracterização in vitro das microesferas de PLGA, contendo LTB4 ou PGE2, foi feita através da determinação da morfologia e medida dos diâmetros médios, taxa de encapsulação e perfil de liberação in vitro dos mediadores. Além disso, foi avaliada a preservação da atividade biológica do LTB4 liberado das microesferas, através do efeito do mesmo sobre a expressão de moléculas de adesão Mac-1 por citometria de fluxo. Também foram avaliadas a preservação da atividade biológica do LTB4 e da PGE2 liberados do interior das microesferas, através de estudos com microscopia intravital e a ativação de células endoteliais humanas (HUVECs e HUAECs). Realizamos ainda, ensaio de fagocitose com as microesferas contendo os dois mediadores encapsulados, utilizando macrófagos peritoneais murinos, além da avaliação da sobrevivência dos animais tratados intranasalmente com microesferas contendo LTB4 ou PGE2 durante a infecção pelo *H. capulatum*. Nestes animais, avaliamos a reação inflamatória pulmonar, o número de UFCs recuperadas dos pulmões e a modulação da resposta imune, através da quantificação de citocinas inflamatórias. Os estudos abordados neste trabalho revelaram achados interessantes e importantes quanto ao uso de microesferas biodegradáveis contendo mediadores lipídicos em situação de terapia, especialmente quando estes estão envolvidos em processos inflamatórios e/ou infecciosos.

Summary: Leukotrienes and prostaglandins are arachidonic acid metabolites, which participate in the inflammatory response and modulate cytokines release in both adaptive and innate immune responses. However, some physicochemical characteristics of these mediators, such as poor solubility in water and chemical instability, make them difficult to administer in vivo. In this study, we developed a polymeric microparticulate system for the encapsulation of lipid mediators. Regarding the in vitro characterization of the microspheres, we determined their diameters, evaluated the in vitro release of the mediators and the microspheres uptake by peritoneal macrophages. To assess the preservation of the biological activities of these mediators, we conducted intravital microscopy studies and determined the effect of LTB4 and PGE2-loaded biodegradable microspheres on inflammatory mediators release by murine peritoneal macrophages and human endothelial cells. In mice infected by *H. capsulatum*, we investigated the effects of intranasal administration of the microspheres on pulmonary inflammatory response. In this context, we analyzed the inflammatory cells recruited to the bronchoalveolar space, the mice survival and the number of CFUs recovered from the lungs after the administrations. We also assessed the cytokines release by the lung cells after the treatment with microspheres during the course of the infection. In conclusion, our findings showed that biodegradable microspheres could preserve the biological activity of the encapsulated mediators indicating their use as a new strategy to modulate cell activation, especially in the innate immune response.

Comissão: Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli
Profa. Dra. Arlete Aparecida Martins Coelho Castelo
Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Profa. Dra. Juliana Maldonado Marchetti
Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato Martins

Aluno: Taísa Magnani Dinamarco

Orientadora: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Defesa: 26/09/2008

Título: Clonagem, expressão e caracterização do gene da oxidase alternativa mitocondrial de *Aspergillus fumigatus*

Title: Cloning, functional expression, and biochemical characterization of an alternative oxidase mitochondrial gene from *A. fumigatus*

Resumo: O *Aspergillus fumigatus* é um fungo filamentosos e saprofítico, encontrado em todas as regiões do mundo, desempenhando um importante papel na reciclagem de carbono e nitrogênio do solo. A principal forma de infecção ocorre através da inalação dos conídios com predominância de infecções no trato respiratório, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A mitocôndria de *A. fumigatus* foi caracterizada em nosso laboratório, que revelou a presença de uma respiração resistente a cianeto mediada pela oxidase alternativa. A clonagem e sequenciamento deste gene foram realizadas através de *screening* de uma biblioteca de DNA genômico. O alinhamento das sequências genômica e de cDNA mostrou a presença de dois introns, que após *splicing* codifica uma proteína contendo 352 aminoácidos, possuindo uma massa molecular estimada de 40,84 kDa e um *pI* teórico de 9,51. Além disso, foram identificados domínios altamente conservados (LET, NERMHL, LEEA e RADE—H) que interagem com átomos de ferro e estão contidos em α -hélices propostas como responsáveis pela organização estrutural da enzima. A fim de caracterizar bioquimicamente esta proteína, a sequência de cDNA do gene foi clonada em plasmídeo pYES2 e expressa em *S. cerevisiae* INVSc1 como um modelo eucarioto. Após expressão, a proteína encontrou-se de forma ativa, conferindo à levedura uma respiração resistente a cianeto. Esta característica herdada provocou uma discreta diminuição na taxa de crescimento em meio não-fermentativo e uma capacidade de sobrevivência na presença de KCN. Acredita-se que a atividade das AOXs esteja diretamente relacionada com a presença de diferentes espécies reativas de oxigênio (ERO). Neste contexto, a avaliação do efeito de diferentes agentes pró-oxidantes provocou um aumento na atividade e na expressão da enzima. Paralelamente, a caracterização funcional do gene foi realizada através da técnica de interferência por RNA, utilizando o vetor de expressão pALB1. Em meio contendo maltose, as cepas pALB1/*aoxAf* apresentaram coloração branca devido ao silenciamento do gene *alb1*. Os níveis de mRNA do gene *aoxAf* foram determinados por *Real time RT-PCR*, mostrando o eficiente silenciamento do gene alvo com a construção utilizada. Devido à relação já descrita entre ERO e a atividade das AOXs, avaliou-se a produção de espécies reativas de oxigênio nas cepas silenciadas utilizando-se a sonda CM-H₂DCFDA, observando maior produção na cepa pALB1/*aoxAf*. Além disso, a viabilidade destas cepas foi determinada por citometria de fluxo após a exposição com agentes pró-oxidantes, a qual indicou maior letalidade na cepa pALB1/*aoxAf*, quando comparada com CEA e pALB1. Da mesma forma, após a incubação dos conídios das cepas silenciadas com macrófagos de camundongos foi verificada uma maior atividade microbicida dos macrófagos na cepa duplamente silenciada pALB1/*aoxAf*, quando comparada com as outras cepas. Com estes resultados podemos concluir que a oxidase alternativa apresenta uma importante atividade antioxidante, além de contribuir nos mecanismos de defesa durante o processo de infecção de *A. fumigatus*.

Summary: The saprophytic species *Aspergillus fumigatus* is a deuteromycete fungus found worldwide, which has an essential role in recycling carbon and nitrogen. Following inhalation of conidia by the immunocompetent host, the innate cellular immune system is responsible for killing the conidia, exposing them to reactive oxygen. However, *A. fumigatus* is capable of surviving and replicating within the phagolysosomal compartment of immunocompromised macrophages. It was previously demonstrated that *A. fumigatus* mitochondria possess an alternative oxidase (*aoxAf*) which is a cyanide-resistant protein. A partial genomic DNA library was screened to cloning an *aoxAf* gene. The alignment between the cDNA and genomic DNA sequences revealed the existence of two introns which after *splicing* encodes a 352 amino acid sequence with a calculated molecular mass of 40 kDa and a theoretical *pI* of

9.51. The deduced amino acid sequence revealed four regions completely conserved among the AOXs sequences (LET, NERMHL, LEEA and RADE-H), where six conserved amino acids residues are proposed to be a metal ligand site. To characterize the AOX protein, a cDNA of *aoxAf* gene was cloned into pYES2 plasmid and transformed in *S. cerevisiae* INVSc1. After the incubation of the cells in a nonfermentable medium in the presence of KCN, *S. cerevisiae* expressing AOX was able to grow, while it was lethal for the control yeast. These results suggest that the recombinant AOXAf is properly targeted to the *S. cerevisiae* mitochondria where it has functional activity. Studies with different species demonstrated that AOX is induced by a variety of treatments usually labeled as stresses. To verify the function of AOX in *A. fumigatus* under oxidative stress conditions, conidia were treated with different donors of ROS. These treatments caused an increase in *aoxAf* activity and transcription levels. To identify genetically attributes of virulence and oxidative defense in *A. fumigatus*, we construct a RNA interference plasmid. Two inverted repeated sequences of conserved region of an interest gene were amplified and cloned in pALB1 plasmid. In maltose medium pALB1 and pALB1/*aoxAf* transformants demonstrated white colonies, attributable to the reduction of *alb1* gene expression. The *aoxAf* mRNA levels were analyzed by Real time RT-PCR, showing an efficient alternative oxidase gene silencing in pALB1 plasmid construction. It was previously demonstrated that ROS can stimulate the AOXs activity, so, we used the dye CM-H₂DCFDA to measure ROS production in RNAi transformants, showing that the decrease in *aoxAf* gene expression caused an increase in ROS production. After incubation with ROS donors the viability of these strains was determined by flow cytometry analysis. The pALB1/*aoxAf* strain showed higher lethality, when compared with CEA and pALB1, suggesting the involvement of AOX in antioxidant defense in *A. fumigatus*. Besides, ROS produced by alveolar macrophages play an essential role in the killing of *A. fumigatus* conidia. In the same way, phagocytosis assay revealed that pALB1/*aoxAf* strain was more lethal than CEA and pALB1. With these results, we concluded that alternative oxidase is an efficient antioxidant system and might contribute with defense mechanism of *A. fumigatus*.

Comissão: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura
Prof. Dr. Jiri Borecky
Prof. Dr. Mário Henrique de Barros
Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman
Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui