



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

DOUTORADO – 2009

Aluno: **Andresa Piacenzi Nascimento Rodrigues**

Orientador: Izabel Yoko Ito

Defesa: 21/05/2009

Título: Candida spp. em escovas dentais e eficácia de antimicrobianos na sua desinfecção

Title: Candida spp. on toothbrushes and efficacy of antimicrobial agents for their disinfection.

Resumo: Os objetivos foram avaliar a presença de Candida spp. em escovas dentais; a eficácia do Periogard® e do Neem Sattiva®, em spray, na desinfecção destas escovas; a atividade antimicrobiana, in vitro, do Neem Sattiva®, do Periogard® e da solução de gluconato de clorexidina a 0,5% por meio da Diluição Inibitória Máxima (DIMax); e a capacidade de Candida spp. formar biofilme, in vitro, sobre as cerdas e hastilhas de escovas dentais (empregando a técnica de cultura microbiana e a microscopia eletrônica de varredura). Participaram do estudo clínico randomizado 61 estudantes de Odontologia da FORP – USP. O estudo foi realizado em três etapas. Em cada etapa, os voluntários receberam escovas novas e realizaram a escovação dentária sem dentífrico, por dois minutos. Cada solução foi borrifada sobre as cerdas das escovas por seis vezes. Após quatro horas à temperatura ambiente, as escovas foram submetidas ao processamento microbiológico para o isolamento e identificação das espécies de Candida. A DIMax dos antissépticos foi realizada utilizando o método da diluição em ágar. As escovas dentais de 37,3% dos indivíduos estavam contaminadas por Candida spp. (C. albicans, C. parapsilosis e Candida sp.). O Periogard® e o Neem Sattiva®, em spray, inibiram o crescimento de Candida spp. em 40,9 e 9,1% das escovas, respectivamente. Portanto, o spray de Periogard® foi mais eficaz que o spray de Neem Sattiva® para esse propósito. As DIMaxs do Neem Sattiva®, do Periogard® e da solução de clorexidina a 0,5% frente a 63 cepas de Candida spp. foram 1/10, 1/20 e 1/40, respectivamente. Candida spp. foram capazes de formar biofilme, in vitro, sobre hastilhas (polietileno de baixa densidade) de escovas dentais. O mesmo não ocorreu nas cerdas de náilon.

Summary: The purposes were to evaluate the presence of Candida spp. on toothbrushes; the efficacy of Periogard® and Neem Sattiva®, in spray, in the disinfection of these toothbrushes; the in vitro antimicrobial activity of Neem Sattiva®, Periogard® and solution containing 0.5% chlorhexidine gluconate by the Maximum Inhibitory Dilution (MID); and the ability of Candida spp. to form biofilm in vitro on the bristles and small sticks of toothbrushes (using the microbial culture technique and scanning electron microscopy). In the randomized clinical study participated 61 students matriculated at the Dentistry course of the FORP – USP. The study was performed into three phases. In each phase, volunteers received new toothbrushes and performed toothbrushing with no dentifrice, during two minutes. Each solution was sprayed six times on the toothbrush bristles. After four hours at room temperature, toothbrushes were submitted to microbiological processing for the isolation and identification of Candida species. MID of antiseptics was performed using the agar dilution method. Toothbrushes used by 37.3% of subjects were contaminated by Candida spp. (C. albicans, C. parapsilosis and Candida sp.). Periogard® and Neem Sattiva®, in spray, inhibited growth of Candida spp. in 40.9 and 9.1% of toothbrushes, respectively. Therefore, Periogard® spray was more efficacious than Neem Sattiva® spray for this purpose. MID of Neem Sattiva®, Periogard® and solution containing 0.5% chlorhexidine against 63 Candida spp. strains were 1/10, 1/20 and 1/40, respectively. Candida spp. were able to form biofilm in vitro on the toothbrush small sticks (lowdensity polyethylene). This did not occur on the nylon bristles.

Comissão: Izabel Yoko Ito
Juliane Maria Guerreiro Tanomaru
Juliana Pfrimer Falcão
Marilena Chinali Komesu
Claudia Maria Leite Maffei

Aluno: Camila Marques de Andrade

Orientador: Maria Regina Torqueti

Defesa: 27/11/2009

Título: Avaliação do efeito anti-aterogênico dos fitoestrógenos na expressão de moléculas de adesão em células endoteliais humanas.

Title: Phytoestrogens antiatherogenic effect on adhesion molecules expression on endothelial cells.

Resumo: Os riscos provocados pela Terapia de Reposição Hormonal, levaram à busca de novas terapias, como os fitoestrógenos. São substâncias com ação estrogênica e propriedades que podem retardar a formação de placas ateroscleróticas. Isoflavonas são os fitoestrógenos mais estudados e são encontradas na soja, no "red clover" e em outras plantas. Avaliamos os efeitos dos fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max*: genisteína, formononetina, biocanina A e daidzeína; a mistura entre eles (Mix1); o extrato padronizado de "red clover" (Menoflavon 40mg) e uma segunda mistura com os fitoestrógenos extraídos da *Glycine max* nas concentrações encontradas no Menoflavon (Mix2), na expressão de moléculas de adesão de leucócitos, VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina, em cultura de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC), assim como na linhagem modificada de célula endotelial, ECV304, estimuladas com LPS. Resultados: foram padronizados os tempos e concentrações de exposição ao LPS no cultivo de HUVEC de 1ug durante 12 horas de exposição para as três moléculas de adesão; e no cultivo de ECV304 para a expressão de VCAM-1, de 500ng durante 12 horas, para ICAM-1 de 1ug durante 18 horas, para E-selectina 100ng durante 18 horas na superfície celular e 200ng durante 24 horas no sobrenadante de culturas de ECV304, permitindo que este tipo celular seja utilizado como modelo de inflamação. Os fitoestrógenos reduziram VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina na superfície celular assim como as formas solúveis dessas moléculas, tanto em ECV304 como em HUVEC, sendo efetivos como agentes preventivos e também para tratamento da aterosclerose. A mistura entre os fitoestrógenos não apresentou maior eficiência na redução das moléculas de adesão na superfície celular, mas apresentou diferenças significativas na produção das formas solúveis. Tanto em ECV304, quanto em HUVEC os fitoestrógenos extraídos do red clover e os extraídos da soja *Glycine max* reduziram as moléculas de adesão na superfície celular e no sobrenadante, sendo que o Menoflavon, apresentou maior efetividade na redução das moléculas de adesão que os fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max*, em HUVEC. Ocorreram interações entre os fitoestrógenos e o 17 β estradiol, tanto em ECV304 quanto em HUVEC, principalmente quando este se encontrava em baixas concentrações, sugerindo proteção para mulheres na menopausa. Esses efeitos dos fitoestrógenos ocorreram via receptor de estrogênio, como demonstrado pela inibição de suas ações por ICI. Conclusão: tanto os fitoestrógenos extraídos da soja *Glycine max* quanto os extraídos do red clover apresentaram efeitos anti-aterogênicos, podendo atuar como cardioprotetores para mulheres pós-menopausa.

Summary: The risks of hormone replacement therapy have led to a search for new alternatives such as the use of phytoestrogens, plant compounds with estrogen-like biological activity. Isoflavones are the phytoestrogens most extensively studied and can be found in soy, red clover and other plants. Due this estrogen-like activity phytoestrogens can have some effect on atherosclerosis. We evaluated the effects of the phytoestrogens extracts from *Glycine max* soy: genistein, formononetin, biocanin A and daidzein; a Mix between them (Mix1); a standardized red clover extracts (Menoflavon 40mg) and a second Mix using phytoestrogens from *Glycine max* with same Menoflavon concentrations (Mix2) on adhesion molecules expression, VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin by endothelial cell HUVEC, and by endothelial cell line ECV304, stimulated with LPS. Results: were standardized time and concentration to LPS exposure, being 1ug during 12 hours for the three adhesion molecules expression on HUVEC, and 500ng during 12 hours for VCAM-1 expression, 1ug during 18 hours for ICAM-1 expression and 100ng during 18 hours for E-selectin expression on cell surface as well as 200ng during 24 hours to E-selectin increase on culture supernadant, on ECV 304 cell line. The phytoestrogens decreased VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin levels on cell surface and on culture supernadant in HUVEC and ECV304, being useful as preventive agents as well as

treatment agents. Mix1 were not most effective than isolated phytoestrogens on cell surface, but presented decreased results on soluble forms. Menoflavon presented more effectiveness than Glycine max on HUVEC. Phytoestrogens interacted with 17β oestradiol mainly, in low concentrations (10pg), showing protection for post menopausal women. These phytoestrogens effects happened by oestrogen receptor activation, this was demonstrated through phytoestrogens inhibition by ICI. Conclusions: the phytoestrogens from Glycine max as well as phytoestrogens from red clover presented antiatherogenic effects, mainly when 17β estradiol is low, being usefull for postmenopausal women.

Comissão: Maria Regina Torqueti
Carolina Sales Vieira Macedo
Geraldo Duarte
Cleni Mara Marzocchi Machado
Luciana Simon Pereira Crott

Aluno: **Elainy Patrícia Lino Gasparotto**

Orientador: Ana Maria de Souza

Defesa: 15/04/2009

Título: Expressão de genes e proteínas pró- e anti-apoptóticas em células precursoras da medula óssea e leucócitos do sangue periférico de pacientes portadores de policitemia vera.

Title: Pro- and anti-apoptotic genes and proteins expression in bone marrow precursors and peripheral blood leukocytes in polycythemia vera patients.

Resumo: A policitemia vera (PV) é uma doença mieloproliferativa clonal que afeta o progenitor hematopoético multipotente causando o acúmulo de eritrócitos, leucócitos e plaquetas morfológicamente normais e seus precursores, na ausência de um estímulo definido. Alterações na regulação da apoptose parece ser uma das causas do acúmulo de células eritróides sem a necessidade de eritropoetina. A mutação JAK2 V617F foi descrita como um dos eventos envolvidos na fisiopatologia das Doenças Mieloproliferativas Crônicas, sendo relacionada a um pior prognóstico. Esta mutação resulta na ativação constitutiva da enzima Janus Kinase 2 e conseqüentemente das vias de sinalização associadas ao estímulo celular mediado por citocinas e fatores de crescimento. O objetivo deste estudo foi investigar as alterações da expressão de proteínas e genes envolvidos na regulação da apoptose em pacientes com PV sem tratamento. Para tanto foi quantificada a expressão de genes e proteínas da família Bcl-2 e da via extrínseca da apoptose em células precursoras e leucócitos desses pacientes e de indivíduos saudáveis. Os leucócitos do sangue periférico de 12 pacientes e 14 controles foram obtidos pelo método de Haes-esteril. As células precursoras CD34+ destes pacientes e de 19 controles foram separadas em coluna imunomagnética. A detecção da expressão gênica e protéica das moléculas anti- e pró-apoptóticas foi realizada pelas técnicas de PCR em tempo real e Western-blot, respectivamente. Foi avaliada ainda a resistência à morte celular induzida por agentes apoptogênicos dos linfócitos dos pacientes. As células CD34+ e maduras mostraram expressão aumentada dos genes a1, mcl-1, noxa, c-flip e ciap-2. A expressão dos genes bid, bim-EL, fas e faim estava elevada e a dos genes bcl-2, bcl-xL e bax diminuída, somente nas células CD34+. Nos leucócitos, observou-se ainda maior nível de expressão do gene bok e expressão diminuída dos genes bcl-2, bcl-xL, bad, bax, faim, dr4, dr5 e trail. Os genes bcl-w, bak, bik, fasL e ciap-1 não mostraram diferença significativa na expressão em células CD34+ e leucócitos de pacientes e controles ($p > 0,05$). Houve significância estatística nas correlações entre: expressão de dr5 e mutação JAK2 V617F; bim-EL com concentração de hemoglobina e com hematócrito; bcl-w e número de plaquetas; a1, bad, bax nas células CD34+ e bad em leucócitos com aumento do baço. Os linfócitos dos pacientes foram mais resistentes a apoptose mediada por ACT D 1 μ M e 5 μ M, ARA-C 25 μ M, CHX 25 μ M, VP-16 e VM-26 25 μ M. Houve correlação entre a percentagem de alelos mutados para JAK2 V617F e o perfil de resistência aos indutores de apoptose dos linfócitos dos pacientes a ACT D 1 μ M e 5 μ M e STS 5 μ M. Observou-se ainda correlação estatística entre: expressão de a1 com ACT D 5 μ M, CHX 50 μ M e ARA-C 25 μ M; bad com CHX 25 μ M e teniposídeo 25 μ M; bcl-2 com ACT D 5 μ M, CHX 50 μ M, STS 1 μ M e 5 μ M e VP-16 a 25 μ M; bid com ACT D 5 μ M e VM-26 25 μ M; bik com ACT D 5 μ M, STS 1 μ M e 5 μ M e VM-26 25 μ M, ARA-C 25 μ M e VP-16 25 μ M; bim-EL com CHX 25 μ M e teniposídeo 25 μ M; bok com ACT D 5 μ M STS 1 μ M e 5 μ M, ARA-C 25 μ M e etoposídeo 25 μ M; ciap-1 com ACT D 1 μ M e 5 μ M, STS 1 μ M e VP-16 25 μ M; dr4 com ACT D 5 μ M, ARA-C 25 μ M, VP-16 a 25 μ M; dr5 com ACT D 5 μ M, STS 1 μ M, ARA-C 25 μ M e VP-16 25 μ M; faim com ACT D 5 μ M; mcl-1 com ARA-C 25 μ M e STS 1 μ M; trail com ACT D 5 μ M. As proteínas A1, BAD e c-FLIP tiveram o mesmo perfil de expressão dos seus respectivos genes, contudo os níveis de expressão protéica para BCL-xL estavam aumentados e para BIM-EL diminuídos, resultados discordantes com os obtidos nas expressões gênicas. Em conjunto esses resultados sugerem que a maquinaria apoptótica está desregulada, o que poderia contribuir, pelo menos em parte, com a mieloacumulação observada no SP e MO dos pacientes com PV.

Summary: Polycythemia vera (PV) is a clonal myeloproliferative disease arising in a multipotent haematopoietic progenitor cell causing the accumulation of erythrocytes, leukocytes and platelets morphologically normal and their precursors in absence of a definable stimulus.

Apoptosis deregulation seems to be one of the causes of erythroid cells accumulation without the need for erythropoietin. The JAK2 V617F mutation has been described as one of the events involved in pathophysiology of chronic myeloproliferative diseases, being related to worse prognosis. This mutation results in constitutive activation of the enzyme Janus kinase 2 and consequently of signaling pathways associated with cell stimulation mediated by cytokines and growth factors. This study aimed to investigate changes in expression of proteins and genes involved in regulation of apoptosis in PV patients without treatment. Was quantified for both gene and proteins expression of the Bcl-2 family and the extrinsic pathway of apoptosis members in precursor cells and leukocytes of patients and healthy subjects. Peripheral blood leukocytes of 12 patients and 14 controls were obtained by the Haes-sterile method. CD34+ precursor cells of these patients and 19 controls were separated by immunomagnetic column. Anti- and pro-apoptotic gene and protein expression detection was performed by real-time PCR and Western-blot techniques respectively. It also assessed the resistance to cellular death induced by apoptogenic agents in PV lymphocytes. CD34+ and mature cells showed increased expression of a1, mcl-1, noxa, c-flip and ciap-2. Gene expression of bid, bim-EL, fas and faim was high and to genes bcl-2, bcl-xL and bax diminished, only in CD34+ cells. In leukocytes, there was even greater level of expression of bok and reduced of bcl-2, bcl-xL, bad, bax, faim, dr4, dr5 and trail. Not significant difference was found to bcl-w, bak, bik, fasL and ciap-1 expression in CD34+ cells and leukocytes of patients and controls ($p > 0.05$). There was statistical correlation between: dr5 expression and JAK2 V617F mutation; bim-EL with hemoglobin concentration and hematocrit; bcl-w and platelets counts; a1, bad, bax in CD34+ cells and bad in leukocytes with enlarged spleen. PV lymphocytes were more resistant to apoptosis mediated by ACT D 1uM and 5uM, ARA-C 25uM, CHX 25uM, VP-16 25uM and VM-26 25uM. There was correlation between JAK2 V617F allele burden and resistance profile to apoptosis inducers in PV lymphocytes to ACT D 1uM and 5uM and STS 5uM. There was also correlation between: a1 expression with ACT D 5 uM, CHX 50uM and ARA-C 25uM; bad with CHX 25uM and teniposide 25uM; bcl-2 with ACT D 5uM, CHX 50uM, STS 1uM and 5uM and VP -16 25uM; bid with ACT D 5uM and VM-26 25uM; bik with ACT D 5uM, STS 1uM and 5uM, VM-26 25uM, ARA-C 25uM and VP-16 25uM; bim-EL with CHX 25uM and teniposide 25uM ; bok with ACT D 5uM, STS 1uM and 5uM, ARA-C 25uM and etoposide 25uM; ciap-1 with ACT D 1uM and 5uM, STS 1uM and VP-16 25uM; dr4 with ACT D 5uM, ARA-C 25uM, VP-16 25uM; dr5 with ACT D 5uM, STS 1uM, ARA-C 25uM and VP-16 25uM; faim with ACT D 5uM, mcl-1 with ARA-C 25uM and STS 1uM; trail with ACT D 5uM. The A1, BAD and c-FLIP proteins have the same profile of expression of their genes, however the levels of protein expression in BCL-xL were increased and decreased for BIM-EL, discordant results in related with the one obtained by gene expressions. Taken together these results suggest that apoptotic machinery is deregulated, which could contribute, at least in part, with myeloaccumulation observed in the SP and BM of PV patients.

Comissão: Ana Maria de Souza
Rodrigo Proto de Siqueira
Fabíola Attié de Castro
Aparecida Maria Fontes
Belinda Pinto Simoes

Aluno: **Fabília Helena Santello**

Orientador: José Clóvis do Prado Júnior

Defesa: 13/10/2009

Título: Efeito da administração de melatonina em ratos orquiectomizados e infectados com *Trypanosoma cruzi*.

Title: Effect of melatonin administration in rats orchietomized and infected with *Trypanosoma cruzi*.

Resumo: Os esteróides gonadais exercem importantes influências no direcionamento da resposta imune do hospedeiro frente à infecção. Alterações decorrentes de sua ausência ou reposição podem significar em uma evolução distinta de determinada parasitose. Existe também uma relação entre a produção de melatonina e o ritmo de atividade do sistema imune. A resposta imune depende de uma interação entre inúmeros hormônios que irão agir sinergicamente com distintas células imunes. O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito dos hormônios sexuais masculinos, através da orquiectomia, e da administração oral de melatonina sobre a resposta imune de ratos Wistar machos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, durante a fase aguda da doença de Chagas experimental. Inúmeros parâmetros foram avaliados, entre eles: parasitemia, histologia cardíaca, peso dos animais e órgãos, linfoproliferação de timócitos e esplenócitos, quantificação de macrófagos, dosagem de óxido nítrico, citometria de fluxo para avaliação das populações de CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺; e ensaios imunológicos como IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-10. Observou-se em todos os parâmetros analisados a ação sinérgica da melatonina e da orquiectomia sobre o sistema imune, favorecendo uma resposta positiva contra o parasita na fase aguda da infecção. Dessa forma, concluiu-se que a melatonina e a redução dos hormônios sexuais masculinos exerceram um papel imunestimulador importante, que se refletiu em uma resposta mais efetiva do hospedeiro durante a infecção experimental.

Summary: Gonadal steroids exert important influence in the host immune response during infection. Changes resulting from the absence or replacement of these hormones may represent a distinct evolution of a particular parasite. There is also a relationship between melatonin production and the rhythmic activity of the immune system. The immune response depends on the interaction of many hormones that will act synergistically with other immune cells. The objective of this research was to evaluate the effect of male sex hormones through orchietomy, and oral administration of melatonin on the immune response of male Wistar rats infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*, during the acute phase of experimental Chagas' disease. Several parameters were evaluated among them: quantification of blood parasites, heart histology, body weight of animals and organs, lymphoproliferation of thymocytes and splenocytes, quantification of peritoneal macrophages, nitric oxide concentration, alterations in CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ lymphocyte populations by flow cytometry and immunological assays, as IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-10. It was observed in all parameters examined the synergistic action of melatonin and orchietomy on the immune system, promoting a positive response against the parasite in the acute phase of infection. Thus, it was concluded that melatonin and the absence of male sex hormones exerted an important immunostimulating role, which reflected a more effective host's response during the experimental infection.

Comissão: Jose Clovis do Prado Junior
Joao Aristeu da Rosa
Ana Patrícia Yatsuda Natsui
Antonio Marcos de Aparecida Levy
Sérgio Zucoloto

Aluno: Gabriela Ravanelli de Oliveira Pelegrin

Orientador: Maria José Alves da Rocha

Defesa: 18/06/2009

Título: Participação do óxido nítrico na expressão de vasopressina e ocitocina durante sepse polimicrobiana experimental.

Title: Involvement of nitric oxide in vasopressin and oxytocin expression during experimental polymicrobial sepsis.

Resumo: Sepse induz exagerada produção de mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico (NO), e causa alterações cardiovasculares, neuroendócrinas e de temperatura corporal (Tc). Na fase tardia da sepse existe liberação basal de vasopressina (AVP), apesar da hipotensão persistente. Uma hipótese para isso seria a inibição da síntese de AVP pelo aumento da produção de NO. Nosso objetivo foi investigar a possível participação do NO, produzido centralmente pelas isoformas de NO sintase (NOS), na expressão de AVP e ocitocina (OT), na resposta cardiovascular e de Tc durante sepse experimental. Ratos Wistar receberam injeção i.c.v. de L-NAME, inibidor não seletivo de NOS (250µg/µL), ou de aminoguanidina (AG,250µg/µL), inibidor seletivo da isoforma induzida (NOSi). Outro grupo recebeu inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ,0,25µg/µL). Grupos controles receberam veículos (salina ou DMSO1%). Trinta minutos após as injeções, foi induzido sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP) ou operação fictícia. Os animais foram divididos em 4 grupos: 1) avaliação da sobrevida, 2) determinação da Tc, 3) aferição da pressão arterial (PAM) e frequência cardíaca (FC) e 4) avaliação de parâmetros hidroeletrólíticos e secreção de AVP e OT. A CLP promoveu alta mortalidade, aumentou NO progressivamente, diminuiu PAM e aumentou FC. A concentração plasmática de AVP (AVPp) aumentou na fase inicial da sepse e por seu efeito antipirético pode ter contribuído para a hipotermia observada. A razão de expressão para ambos os hormônios diminuiu nos núcleos supraóxicos (SON) e paraventriculares (PVN). Na fase tardia AVPp estava basal e sua expressão nos SON e PVN mais diminuída do que na fase inicial. A expressão de OT diminuiu somente no SON. O pré-tratamento com L-NAME aumentou a sobrevida, reduziu a produção de NO até 20h, aumentou PAM e Tc, e manteve a FC semelhante ao grupo veículo. AVPp aumentou simultaneamente à diminuição da razão de expressão em ambos os núcleos. Na fase tardia, o grupo L-NAME apresentou NO aumentado e expressão de AVP diminuída, aparentemente contribuindo para AVPp basal e hipotensão. O L-NAME diminuiu a razão de expressão de OT na fase inicial, mas aumentou na fase tardia. A inibição de NOSi pela AG aumentou ainda mais a sobrevida e Tc. Apesar de não bloquear a produção de NO a AG aumentou a expressão de AVP e OT e manteve AVPp constante e acima da basal. Injeção i.c.v de AG aumentou PAM somente na fase inicial da sepse. O pré-tratamento com ODQ foi o mais eficiente em aumentar a sobrevida e Tc após CLP. Entretanto, não alterou o aumento progressivo de NO, e ainda diminuiu a expressão de AVP e OT. A AVPp basal após ODQ contribuiu para a hipotensão observada durante todo o período. Esses resultados mostram que aumento central de NO após CLP inibe a expressão de AVP e OT independente de GMPc no SON e parcialmente dependente no PVN. A inibição da expressão de AVP na fase tardia da sepse resulta em concentração basal do hormônio contribuindo para a hipotensão. Em nossos experimentos o controle da temperatura corporal teve maior contribuição no aumento da sobrevida durante sepse polimicrobiana do que a regulação neuroendócrina e/ou cardiovascular.

Summary: Sepsis induces massive production of inflammatory mediators, such as nitric oxide (NO), and causes cardiovascular, neuroendocrine and body temperature (Tb) alterations. In the late phase of sepsis there is a basal vasopressin (AVP) release despite the persisting hypotension. One reason could be the inhibition of AVP synthesis by the increase in NO production. Our aim was to investigate the possible involvement of NO, produced centrally by NO synthase (NOS) isoforms, on AVP and oxytocin (OT) expression, cardiovascular response and Tb during experimental sepsis. Male Wistar rats received an i.c.v. injection of the non-selective NOS inhibitor L-NAME (250µg/µL), or of aminoguanidine (AG,250µg/µL), a selective inhibitor of its inducible isoform (iNOS). Another group received soluble guanylate cyclase inhibitor (ODQ,0.25µg/µL). Control groups received vehicles (saline or DMSO1%).

Thirty minutes after the injections, sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP), or the rats were sham operated. The animals were divided into 4 groups for: 1) assessment of survival, 2) determination of Tb, 3) measurement of blood pressure (MAP) and heart rate (HR), and 4) evaluation of hydroelectrolytic parameters and AVP and OT secretion. The CLP promoted high mortality and progressive increase in NO levels. It also decreased MAP and increased HR. The AVP plasma concentration (AVPp) increased in the early phase of sepsis and its antipyretic effect may have contributed to the observed hypothermia. The expression ratio of both hormones was reduced in the supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei. In the late phase, AVPp was basal and its expression decreased in both nuclei more than in the initial phase. The OT expression decreased only in the SON. L-NAME pretreatment increased the survival and reduced the NO production until 20h. MAP and Tb were increased, while HR remained similar to that observed in the vehicle control group. AVPp increased simultaneously to the decrease of its expression ratio in both nuclei. In the late phase, the L-NAME group showed NO levels increased and decreased AVP expression, apparently contributing to basal AVPp and hypotension. The L-NAME decreased OT expression ratio in the initial phase, but increased in the late phase. Inhibition of iNOS by AG further increased the survival and Tb. Even though AG did not block NO production, it increased AVP and OT expression and kept AVPp constant and above the baseline. AG pretreatment increased MAP only in the initial phase of sepsis. The ODQ pretreatment was more efficient to increase survival and Tb after CLP. However it neither altered the progressive NO increase nor the decrease in AVP and OT expression ratio. The basal AVPp after ODQ contributed to hypotension observed during the studied period. These results show that the increased central NO levels observed after CLP inhibit cGMP-independent hormone expression in the SON and partially dependent in the PVN. Inhibition of AVP expression, in the late phase of sepsis, results in basal concentrations of this hormone further contributing to hypotension. In our experiments the control of body temperature during polymicrobial sepsis had greater contribution in survival than the neuroendocrine and/or cardiovascular regulation.

Comissão: Maria Jose Alves da Rocha
Jamil Assreuy Filho
Lucila Leico Kagohara Elias
Sergio Akira Uyemura
Jose Antunes Rodrigues

Aluno: Karen Regina Carim da Costa

Orientador: Profa. Dra. Regina Celia Candido

Defesa: 01/08/2010

Título: Aspectos fenotípicos e moleculares da adesão e atividade enzimática de *Candida sp* isoladas de pacientes com sinais clínicos de candidíase oral.

Title: Phenotypic and molecular aspects of adhesion and enzymatic activity of *Candida sp* recovered from patients with clinical signs of oral candidiasis.

Resumo: O amplo espectro da candidíase e respectiva importância clínica da infecção impulsionam as pesquisas que visam esclarecer os mecanismos de patogenicidade e identificação dos fatores de virulência de *Candida sp*. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar através de testes fenotípicos e moleculares a capacidade de adesão, atividade de proteases e variabilidade genética de isolados clínicos de *C. albicans* e *C. tropicalis*. A capacidade de adesão às glicoproteínas de matriz extracelular laminina e fibronectina foi avaliada utilizando-se a técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). A pesquisa de proteases foi realizada pelos métodos semiquantitativo, em placa de ágar com albumina bovina, e quantitativo, em solução-tampão com hemoglobina. A presença dos genes ALS2, ALS3, SAP1, SAP3 e PLB1 foi verificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e os polimorfismos intra e interespecies pela técnica do DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD). Todos os isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram ligação a laminina e a fibronectina immobilizadas. Os isolados Ca33 e Ct13 apresentaram índice de adesão relativa significativamente maiores em relação aos demais isolados para as duas glicoproteínas ($p < 0,001$). A atividade de proteases foi observada em todos os isolados de *C. albicans* tanto pelo método semiquantitativo quanto pelo método quantitativo. A atividade de proteases dos isolados de *C. tropicalis* foi melhor evidenciada através do método quantitativo. A amplificação de fragmentos dos genes relacionados à adesão (ALS2 e ALS3), atividade de proteases (SAP1 e SAP3) e fosfolipase (PLB1) foi observada em todos os isolados de *C. albicans*. Os isolados de *C. tropicalis* não apresentaram produtos de amplificação para os genes pesquisados. A variabilidade genética avaliada pela técnica do RAPD revelou uma população heterogênea em ambas as espécies. No entanto, *C. tropicalis* apresentou maior diversidade genética que *C. albicans*.

Summary: The wide spectrum of candidiasis and its clinical importance encourage the research with the purpose of clarifying the mechanisms of pathogenicity and identification of virulence factors of *Candida sp*. Therefore, the aim of this study was to verify through phenotypic and molecular assays the adhesion, enzymatic activity and genetic variability of clinical *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates. The adhesion ability to the extracellular matrix glycoproteins laminin and fibronectin was evaluated using the ELISA technique (Enzyme-linked immunosorbent assay). The research of proteases was carried out in agar plate containing bovine albumin and through a quantitative method in buffer solution containing hemoglobin. The presence of ALS2, ALS3, SAP1, SAP3 and PLB1 was verified using polymerase chain reaction (PCR) and intra and interspecies polymorphisms through Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique. All *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates binded to immobilized laminin and fibronectin. Ca33 and Ct13 isolates had relative adhesion index significantly higher than the other isolates for both glycoproteins ($p < 0,001$). Protease activity was observed in all isolates of *C. albicans* using either the semi-quantitative or quantitative assay. The protease activity of *C. tropicalis* was better detected through the quantitative assay. The amplification of genes related to adhesion (ALS2 and ALS3), proteases (SAP1 and SAP3) and phospholipase (PLB1) activity using PCR was observed in all *C. albicans* strains. PCR amplification products were not observed in *C. tropicalis* isolates for the researched genes. The genetic variability by RAPD revealed an heterogeneous population in both species. Nevertheless, *C. tropicalis* presented higher genetic variability than *C. albicans* strains.

Comissão: Regina Celia Candido
Cristiane Yumi Koga Ito
Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Ana Patricia Yatsuda Natsui
Claudia Maria Leite Maffei

Aluno: Leony Cristina Caetano

Orientador: José Clóvis do Prado Júnior

Defesa: 09/09/2009

Título: Administração de deidroepiandrosterona (DHEA) como mediador da resposta imune em ratos jovens e senis infectados com *Trypanosoma cruzi* submetidos ao estresse repetitivo.

Title: Administration of the dehidroepiandrosterone (DHEA) as mediador of the immune response in Young and ageing rats infected with *Trypanosoma cruzi* submitted to repetitive stress.

Resumo: A doença de Chagas representa um importante problema para a Saúde Pública na América Latina, onde o tratamento é limitado principalmente na fase crônica. Mesmo controlando a replicação parasitária, a completa eliminação do parasita e a cura da doença não são observadas de forma consistente. A ativação do eixo adrenal-hipotálamo-hipófise possui um papel importante na supressão do sistema imune. Neste trabalho foram observados os efeitos do estresse repetitivo em ratos *Wistar* infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* durante as fases aguda e crônica da doença experimental, através da exposição dos animais a vapores de éter por um minuto duas vezes ao dia. O estresse repetitivo provocou aumento do número de parasitas e a administração de DHEA reduziu significativamente a parasitemia durante a fase aguda. A resposta TH-1 foi mais vigorosa em animais submetidos à terapia com DHEA mesmo quando submetidos ao estresse repetitivo. Assim TNF- α , IFN- γ , IL-2, NO e linfoproliferação mostraram concentrações mais elevadas quando comparadas aos animais não submetidos à terapia. A resposta TH-2 nos grupos sem suplementação com DHEA, IL-4 e IL-10 apresentaram valores reduzidos nos animais infectados e estressados submetidos à terapia com DHEA. A concentração de corticosterona mostrou-se elevada para animais estressados e infectados em relação aos animais submetidos a terapia com DHEA. A histopatologia apresentou redução no número de neurônios nas fases aguda e crônica para os animais estressados e infectados, os mesmos apresentaram desorganização tecidual cardíaca com aumento do número de ninhos de amastigotas e moderado processo inflamatório por células mononucleares. Estes resultados sugerem que o estresse repetitivo pode ser considerado como um fator importante durante o desenvolvimento da doença de Chagas experimental, aumentando sua patogênese através de distúrbios do sistema imune do hospedeiro.

Summary: Chagas' disease represents an important public health problem in Latin American, where the treatment is limited especially to chronic phase, besides the harmful side effects. Although controlling the parasite replication, the complete elimination of the etiologic agent still was not observed. Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis plays a major role in the suppression of the immune system. We have investigated the effects of repetitive stress on *Wistar* rats infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi* during the acute and chronic phases of the experimental disease by the exposure to ether vapor for one minute twice a day. Repetitive stress resulted in an elevated number of circulating parasites and DHEA administration reduced significantly blood parasites during the acute phase. Several immunological parameters were evaluated. TH-1 response was more vigorous in animals submitted to DHEA therapy even those which underwent repetitive stress. So, TNF- α , IFN- γ , IL-2, NO and lymphoproliferation displayed enhanced concentrations as compared to unsupplied animals. The TH-2 immune response in groups without DHEA supplementation, showed reduce values for IL-4 and IL-10 in groups infected and stressed submitted to DHEA therapy. Enhanced corticosterone concentration was a observed for infected and stressed animals. DHEA triggered reduced levels of corticosterone. The histopathology revealed that stressed animals showed a reduction in the number of neurons. Histological sections of heart smears from infected and stressed animals displayed deep tissue disorganization, increased parasite burdens and moderate diffused mononuclear inflammatory process. These results suggest that repetitive stress could be considered an important factor during development of experimental Chagas' disease, enhancing pathogenesis through disturbance of the host's immune system.

Comissão: Jose Clovis do Prado Junior
Joao Aristeu da Rosa

Antonio Marcos de Aparecida Levy
Ana Amelia Carraro Abrahão
Gloria Emilia Petto de Souza