



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

DOUTORADO – 2010

Aluno: **Daniele da Silva Ferreira**

Orientador: Sérgio de Albuquerque

Defesa: 17/06/2010

Título: Propriedades terapêuticas de triterpenos ácidos na doença de Chagas experimental - avaliação em fase aguda da infecção

Title: Therapeutic properties of triterpene acids in experimental Chagas' disease - evaluation in the acute phase of infection.

Resumo: A doença de Chagas é um problema de saúde pública, com dados preocupantes referentes ao número de pessoas contaminadas e daquelas que ainda permanecem expostas ao risco de infecção. As doenças tropicais desafiam as pesquisas científicas, pois os medicamentos existentes apresentam sérios efeitos colaterais. As tripanossomíases são doenças de grande importância no Brasil, como é o caso da doença de Chagas. Estudos realizados em diversos países têm relatado que muitas espécies vegetais possuem atividade contra o agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*. Ácido ursólico e seu isômero, ácido oleanólico, pertencem à classe de compostos triterpenóides e são amplamente distribuídos no reino vegetal e têm sido frequentemente isolados como mistura isomérica. Nesse sentido, a proposta para o presente estudo foi avaliar a atividade tripanocida, sobre a cepa Y e Bolívia de *T. cruzi*, dos triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico, sintetizar e avaliar a atividade tripanocida do sal derivado de ácido ursólico. As substâncias foram administradas nas concentrações de 20 e 50 mg/kg por via intraperitoneal e oral, após a avaliação da dose letal média (DL50). As três substâncias empregadas nas concentrações de 20 e 50 mg/kg, administradas por via intraperitoneal não foram capazes de reduzir a parasitemia dos animais experimentalmente infectados com as cepas Y e Bolívia de *T. cruzi*. Entretanto, as três substâncias exibiram atividade tripanocida significativa, na concentração de 50 mg/kg, administradas por via oral, em animais infectados com a cepa Y de *T. cruzi*. Para a cepa Bolívia de *T. cruzi*, as substâncias administradas por via oral exibiram atividade biológica na concentração de 20 mg/kg, sendo significativa apenas para o triterpeno ácido ursólico. A análise histológica realizada não demonstrou uma correlação significativa entre os níveis parasitêmicos e o parasitismo tecidual, para todos os grupos avaliados. A avaliação do perfil hepatobiliar e renal das substâncias foi realizada a fim de se verificar possíveis efeitos tóxicos das mesmas. Entretanto, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o grupo controle, indicando que o aumento dos níveis parasitêmicos não está associado ao efeito das substâncias no tecido. Através da avaliação do efeito dos triterpenos sobre a resposta imune, verificamos uma diminuição dos níveis plasmáticos de IFN- e um aumento das concentrações de IL-10. Dessa maneira, nós sugerimos que o tratamento com essas substâncias pode direcionar a resposta imune para o padrão Th2 e, em consequência desse efeito imunossupressor, uma maior quantidade de formas tripomastigotas poderia ser observada na circulação do hospedeiro.

Summary: Chagas disease is a public health problem with worrisome data on the number of infected people, not to mention the population that still remains at risk of infection. Tropical diseases defy scientific research since the existing drugs have serious side effects. Trypanosomiasis, such as Chagas disease, are of great importance in Brazil. Studies in several countries have reported that many plant species display activity against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. Ursolic acid and its isomer, oleanolic acid, belong to a class of triterpenoid compounds that is widely distributed in the plant kingdom and has frequently been isolated as an isomeric mixture. In the present study, the tripanocidal activity of the

triterpenoids ursolic acid and oleanolic acid was evaluated against the Y and Bolivia strains of *T. cruzi*. In addition, the potassium salt derivative of ursolic acid was synthesized and also tested. The triterpenoids were administered intraperitoneally and orally at concentrations of 20 and 50 mg / kg, after evaluation of the median lethal dose (LD50). At the concentrations of 20 and 50 mg / kg, the intraperitoneal administration of each of the substances was not able to reduce parasitemia of the animals infected with the Y and Bolivia strains of *T. cruzi*. However, ursolic and oleanolic acid, as well as the potassium salt derivative of ursolic acid exhibited significant trypanocidal activity at a concentration of 50 mg / kg when they were orally administered to animals infected with the Y strain of *T. cruzi*. On the other hand, oral administration of the tested compounds at a concentration of 20 mg / kg evidenced biological activity, which was significant for ursolic acid only. For the most of studied groups, histological analysis did not demonstrate a significant correlation between the levels of parasitemia and tissue parasitism. Determination and evaluation of biochemical parameters in the serum of experimental animals was performed, to assess the hepatic, biliary, and renal toxic effects of the substances. There were no statistically significant differences between the treated groups and the control group, indicating that the increase in parasitemia is not associated with the effects of the substances in the tissue. We suggest the hypothesis of an immunosuppressive effect, since there was a decreased plasma levels of IFN- after treatment with the triterpenes. Moreover, the treated groups also exhibited increased levels of IL-10. Therefore, we suggest that treatment with the substances could be directing the immune response toward the Th2 type and, as a consequence of this immunosuppressive effect, a greater amount of trypomastigotes could be observed in the circulation of the host.

Comissão: Sérgio de Albuquerque
Rosângela Zacarias Machado
João Aristeu da Rosa
Ana Amélia Carraro Abrahão
Clovis Wesley Oliveira de Souza

Aluno: Érika Nascimento

Orientador: Gilberto Ubida Leite Braga

Defesa: 24/02/2010

Título: Efeito da radiação UVB em conídios e micélios dos ascomicetos-modelo *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* e *Metarhizium anisopliae*

Title: Effects of UVB radiation in conidia and mycelia of three model ascomycete fungi: *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* e *Metarhizium anisopliae*

Resumo: Conídios são estruturas especializadas, produzidas assexuadamente pelo micélio de muitas espécies de ascomicetos. A produção dos conídios requer o controle espacial e temporal da expressão gênica e a formação de estruturas específicas durante o desenvolvimento. Os conídios estão envolvidos na reprodução, dispersão e persistência ambiental dos fungos. Em espécies patogênicas como *Aspergillus fumigatus* e *Metarhizium anisopliae*, os conídios também são responsáveis pela infecção do hospedeiro. Um dos principais fatores ambientais capazes de matar e / ou danificar os conídios é a radiação solar. Os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) são os principais fotoprodutos do DNA induzidos pela radiação UVB. Os principais objetivos deste trabalho foram: (1) estimar as frequências de CPDs em conídios expostos a doses subletais de radiação UVB, (2) correlacionar a frequência de CPDs com a cinética de germinação dos conídios, (3) comparar a frequência de CPDs em conídios selvagens com a frequência em conídios mutantes para a pigmentação, (4) identificar genes diferencialmente expressos durante as fases da conidiogênese de *A. fumigatus* e (5) identificar genes modulados pela radiação UVB em micélio jovem de *A. fumigatus*. Conídios de *M. anisopliae*, *A. nidulans* e *A. fumigatus* foram expostos à irradiância de 1000 mW m⁻² de UVB por 15, 30, 60 e 90 min. As doses totais ao final das exposições foram 0,9, 1,8, 3,6 e 5,4 kJ m⁻². O aumento na frequência de CPDs foi linear e diretamente proporcional à dose, com 0,215, 0,455, 0,803 e 1,628 CPDs 10 kb⁻¹ induzidos pelas doses de 0,9, 1,8, 3,6 e 5,4 kJ m⁻² em *A. fumigatus*, 0,037, 0,077, 0,142 e 0,202 CPDs 10 kb⁻¹ em *A. nidulans* e 0,041, 0,085, 0,155 e 0,255 CPDs 10 kb⁻¹ em *M. anisopliae*. A frequência de CPDs no mutante albino de *M. anisopliae* (0,552 10 kb⁻¹) foi aproximadamente dez vezes maior do que na linhagem selvagem (0,057 10 kb⁻¹) após exposição à dose de 1,8 kJ m⁻². Esta é a primeira evidência direta de que a pigmentação dos conídios protege o DNA contra os danos induzidos pela radiação UVB. Microarranjos genômicos de DNA foram utilizados para comparar os transcriptomas de micélios com 20 h (início da conidiogênese), 24 h (fase intermediária) e 25 h (fase final) com o transcriptoma de micélio jovem. Foram identificados 34 genes diferencialmente expressos (7 com aumento e 27 com diminuição) com 20 h de desenvolvimento, 101 genes (12 com aumento e 89 com diminuição) com 24 h e 76 genes (oito com aumento e 68 com diminuição) com 25 h. Alguns genes que apresentaram aumento na expressão (*stuA* e o gene da scytalone desidratase) já haviam sido associados com fases específicas da conidiogênese, entretanto a maioria dos genes que apresentou aumento na expressão não tem função conhecida. A análise de transcriptomas com microarranjos de DNA também foi utilizada para identificar genes com expressão modulada por exposições à radiação UVB (1,8 kJ m⁻²) em micélio jovem de *A. fumigatus*. Foram identificados 101 genes diferencialmente expressos ao final da exposição à radiação UVB (51 genes com aumento e 50 com redução). O gene *radc* apresentou o maior aumento na expressão (aproximadamente 16 ×). A maioria dos genes com aumento na expressão não possui função conhecida. Foram identificados 418 genes diferencialmente expressos 30 min após o término da exposição (51 genes com aumento e 367 com redução na expressão).

Summary: Conidia are specialized structures produced asexually during mycelia growth of many ascomycete species. The process of conidiation involves temporal and spatial regulation of gene expression, cell specialization, intercellular communication, and formation of specific structures during fungal growth. Conidia are responsible for the reproduction, dispersal and environmental persistence of many fungal species. In pathogenic species like *Aspergillus fumigatus* and *Metarhizium anisopliae*, conidia are also responsible for host infection. One of the main environmental factors that can kill and/or damage conidia is solar UV radiation. Cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) are the major DNA photoproducts induced by UVB.

The principal goals of the present study were to: (1) estimate the frequency of CPDs induced by sublethal doses of UVB radiation in conidial DNA of three selected ascomycetes, (2) examine correlation of CPD frequencies with germination speed, and (3) estimate the protective effect of the wild-type green conidial pigmentation on DNA in *M. anisopliae* var. *anisopliae*, (4) identify differentially expressed genes during the different phases of *A. fumigatus* conidiogenesis and (5) identify genes regulated by UVB radiation in *A. fumigatus* young mycelia. *A. fumigatus*, *A. nidulans*, and *M. anisopliae* conidia were exposed to 1000 mW m⁻² UV irradiance for 15, 30, 60 and 90 min. Total Quate-weighted doses were 0.9, 1.8, 3.6 and 5.4 kJ m⁻², respectively. The frequencies of dimers were linear and directly proportional to the doses, with 0.215, 0.455, 0.803 and 1.628 CPDs 10 kb⁻¹ detected at the doses of 0.9, 1.8, 3.6 and 5.4 kJ m⁻² in *A. fumigatus*, 0.037, 0.077, 0.142 and 0.202 CPDs 10 kb⁻¹ in *A. nidulans*, and 0.041, 0.085, 0.155 and 0.255 CPDs 10 kb⁻¹ in *M. anisopliae*. The frequency of dimers in the *M. anisopliae* albino mutant DWR 180 (0.552 10 kb⁻¹) was approximately ten times higher than of the wild-type ARSEF 23 strain (0.057 10 kb⁻¹) after exposure to doses of 1.8 kJ m⁻². DNA microarrays carrying sequence of 11,000 genes of *A. fumigatus* were used to compare transcriptomes of 20 h-old mycelia (initial phase of the conidiogenesis), 24 h (intermediate phase) e 25 h (final phase) with young mycelia transcriptome. Thirty-four genes displayed a statistically significant difference in expression (7 with increase and 27 with decrease mRNA expression) in 20 h-old mycelia, 101 genes (12 with increase and 89 with decrease) in 24 h-old mycelia and 76 genes (8 with increase and 68 with decrease) in 25 h-old mycelia. Some overexpressed genes (*stuA* ad the scytalone dehydratase gene) were previously related to specific phases of conidiogenesis but the function of most of them is unknown. Transcriptome analysis using microarrays was also used to identify genes modulated by exposures to UVB radiation (1,8 kJ m⁻²) in *A. fumigatus* young mycelia. One hundred and one differentially expressed genes were identified at the end of the exposure to UVB radiation (51 genes with increase and 50 with decrease). The *radc* gene displayed the higher increase in expression (approximately 16 ×). The function of most of the overexpressed genes is unknown. Four hundred and eighteen differentially expressed genes were identified 30 min after the end of exposure (51 genes with increase and 367 with decrease in expression).

Comissão: Gilberto Ubida Leite Braga
Paulo Sergio Rodrigues Coelho
Regina Celia Candido
Elza Tiemi Sakamoto Hojo
Marcia Eliana da Silva Ferreira Balieiro

- Aluno:** Viviane Rodrigues Esperandim
- Orientador:** Sérgio de Albuquerque
- Defesa:** 24/06/2010
- Título:** Perfil tripanocida de lignanas dibenzilbutirolactônicas: avaliação das propriedades terapêuticas *in vivo* nas fases aguda e crônica da doença de Chagas experimental
- Title:** Trypanocidal profile of dibenzylbutyrolactone lignans: evaluation of therapeutic properties *in vivo*, in acute and chronic experimental Chagas' disease
- Resumo:** A doença de Chagas, transmitida pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta mais de 18 milhões de pessoas na América Latina e mesmo tendo sido descrita há 100 anos por Carlos Chagas, esta ainda representa um importante problema de saúde pública, sendo encontrados casos em 18 países em desenvolvimento na América do Sul e Central. No Brasil, o benzonidazol, (ROCHAGAN), é a única droga de atividade tripanocida disponível no mercado mesmo apresentando vários efeitos colaterais e limitada eficácia na fase crônica da infecção. Em vista da necessidade de novas substâncias com atividade biológica sobre *T. cruzi*, o interesse pela pesquisa vem crescendo com o intuito de se obter compostos capazes de atuarem sobre o parasita, desprovidos dos graves efeitos colaterais. Estudos desenvolvidos em nosso laboratório envolvendo lignanas demonstraram uma importante atividade destes compostos sobre as formas tripomastigotas sanguíneas. Assim este estudo tem como objetivo avaliar a atividade terapêutica de derivados de lignana dibenzilbutirolactônicas em sistema *in vivo*, em fase aguda e crônica da infecção por *T. cruzi*. Como critérios de estudo avaliamos o comportamento parasitêmico dos animais na fase aguda, quantificamos a enzima -galactosidase nos tecidos do fígado, baço e coração além da análise morfométrica dos tecidos. Com relação à parasitemia, dos animais na fase aguda, as substâncias cubebina e hinoquina, apresentaram significativa redução parasitêmica comparado ao controle negativo e melhor atividade no tratamento pela via oral. Na análise por caracterização de -galactosidase, as substâncias apresentaram melhores resultados comparados ao controle positivo (Benzonidazol) e também melhor eficácia da resposta para o tratamento pela via oral. Nos resultados apresentados pela cariometria os grupos de tratamento com as substâncias cubebina e hinoquinina apresentaram valores próximos ao controle não infectado, mostrando que ocorreu uma resposta celular positiva comparado ao controle infectado.
- Summary:** Chagas disease, transmitted by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects over 18 million people in Latin America. Even though it was described 100 years ago by Carlos Chagas, it still represents a major public health problem, and there are cases in 18 developing countries located in Central and South America. In Brazil, benznidazole (Rochagan) is the only trypanocidal drug available in the market; however, it has several side effects and limited efficacy in the chronic phase of the infection. In view of the need for new substances with biological activity against *T. cruzi*, there is growing interest in the search for compounds capable of acting on the parasite, but are devoid of serious side effects. Studies involving lignans developed in our laboratory have shown that these compounds are significantly active against bloodstream trypomastigotes. So this study aims to evaluate the therapeutic activity of derivatives of dibenzylbutyrolactone lignans *in vivo*, in the acute and chronic infection by *T. cruzi*. The present study examined the degree of parasitemia in the infected animals during the acute phase of the disease. To this end, the enzyme -galactosidase was measured in the tissues from the liver, spleen, and heart of infected animals, in addition to the morphometric analysis of these tissues. Cubebin and hinokinin led to significant reduction in parasitemia compared to the negative control, and better treatment was accomplished by the oral route. Concerning -galactosidase analysis, cubebin and hinokinin furnished better results compared to the positive control (Benznidazole), the most effective response to treatment being also achieved by oral route. Karyometry also revealed that cubebin and hinokinin were effective, giving values close to those obtained with the uninfected control, thereby showing that there was a positive cellular response.

Comissão: Sérgio de Albuquerque
Clovis Wesley Oliveira de Souza
Jose Clovis do Prado Junior
Gutemberg de Melo Rocha
Mara Cristina Pinto