



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

DOUTORADO – 2011

Aluno: Cristiane Fernandes de Freitas Tavares

Orientador: Ana Maria de Souza

Defesa: 03/10/2011

Título: Estudo dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento das anemias hipocrômicas microcíticas em crianças na fase escolar

Title: Study about the main factors contributing to the development of hypochromic microcytic anemia in school children

Resumo: Vários fatores contribuem para o desenvolvimento da anemia, que constitui um dos mais graves problemas de saúde pública. A anemia hipocrômica microcítica é a forma mais comum em crianças e adolescentes. Dentre as causas desta anemia estão: a) deficiência de ferro, que resulta de um longo período do balanço negativo do micronutriente e causa retardo no crescimento e comprometimento do desempenho cognitivo de crianças; b) contaminação por chumbo (plumbismo) que também afeta o desenvolvimento das crianças, podendo ser agravada nos portadores de polimorfismo da enzima ALAD; c) hemoglobinopatias (hemoglobinas variantes e talassemias), anemias herdadas que afetam 7% da população mundial. Devido à alta prevalência destas patologias, o presente trabalho teve como objetivo estudar um grupo de crianças de escolas públicas, identificando os fatores que contribuem para o desenvolvimento de anemias hipocrômicas microcíticas e estabelecer relações entre as características laboratoriais das doenças. Participaram do estudo 427 crianças, com idade entre 6 a 9 anos, sendo 235 do sexo feminino e 192 do sexo masculino, alunos de Escolas Municipais e Estaduais, da zona norte da cidade de Ribeirão Preto-SP. Foram analisados: a) número global de eritrócitos e leucócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos e distribuição da amplitude das células vermelhas (contador automático Micros 45 – Horiba ABX®) e cálculo do índice matemático RDWI; b) níveis plasmáticos de chumbo (espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado VG Plasmaquad PQII®) e estudo das deleções dos polimorfismos da enzima ALAD, por PCR; c) status férrico pelos níveis de ferritina sérica (imunoquimioluminescência utilizando kit Ferritin Immulite – DPC® e equipamento Immulite 1 - DPC®), receptor de transferrina solúvel (ensaio imunoenzimático, utilizando o kit Quantikine soluble transferrin receptor da R&D Systems® e o leitor de microplacas de ELISA READER 210, modelo Microwell System Organon Teknika®) e cálculo do índice sTfR/log ferritina; d) análise das hemoglobinas por eletroforese em acetato de celulose, pH alcalino, por HPLC (sistema automatizado Variant II Bio-Rad® e kit “ β -talassemia Short Program) e PCR para a principal deleção de α -talassemias. Com base no critério recomendado pela OMS para definir anemia (Hb menor que 11,5 g/dL), verificou-se que 75 (17,6%) crianças eram anêmicas, sendo 33 (44%) portadoras de algum tipo de hemoglobinopatia, 29 (38,6%) com anemias de causa desconhecida e 13 (17,4%) com anemia por deficiência de ferro. Das anemias, apenas 14 eram anemias hipocrômicas microcíticas, sendo que 10 (71,4%) eram algum tipo de hemoglobinopatia, 2 (14,2%) ADF e 2 (14,2%) de causa desconhecida. Na população estudada, a prevalência de hemoglobinopatias foi de 16,6% , a saber: 11,6% com α -talassemia; 4% com aumento de Hb F; 3,5% com Hb AS; 2,8% com β -talassemia; 0,96% com α/β -talassemia e 0,24% com Hb AC. Os níveis de chumbo plasmático, em todos os participantes do estudo, estavam dentro do recomendado pelo Center for Disease Control and Prevention (< 10 μ g/dL), não havendo interferência do metal na patogênese das anemias. Não houve associação entre os polimorfismos da ALAD-1 (ALAD1-1 e ALAD1-2) e os níveis de chumbo plasmático. Anemia por deficiência de ferro foi diagnosticada em 3% das crianças e DF em 6,1%, utilizando um cut off de 30 ng/mL para ferritina sérica. Houve

concordância na identificação de hemoglobinopatias utilizando as metodologias eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose e HPLC, sendo que estas metodologias não são úteis para diagnosticar α -talassemia. Para identificar os portadores da deleção de α -talassemia ($-\alpha 3,7$) é necessária a utilização da análise molecular (PCR). A suspeita de Hb S/ β -talassemia identificada por HPLC deve ser confirmada por análise dos pais e/ou irmãos. A ferritina foi um bom parâmetro para identificar DF precocemente e útil para diferenciar os portadores de hemoglobinopatias dos portadores de DF e ADF. O índice sTfR/log da ferritina foi mais sensível do que o sTfR, na diferenciação de DF e talassemia. No diagnóstico das anemias hipocrômicas microcíticas é necessário analisar um conjunto de determinações, incluindo exame hematológico, *status* férrico, perfil eletroforético, em alguns casos incluindo avaliação dos familiares, e análise molecular das hemoglobinopatias.

Summary: Several factors contribute to the development of anemia, which constitutes one of the most serious problems in public health. The hypochromic microcytic anemia is the most common type in children and adolescents. Among the causes for this type of anemia are: a) iron deficiency, which results from a long period of negative balance of the micronutrient, causing delay in growth and compromising the cognitive performance of the children; b) contamination by lead (lead poisoning), which also affects the development of children, and may be aggravated in carriers of polymorphism of the enzyme ALAD; c) hemoglobinopathies (variants hemoglobin and thalassemia), inherited anemia that affects 7% of the world population. Due to the high prevalence of these pathologies, the present study aimed at studying a group of children from public schools, identifying the factors that contribute to the development of hypochromic microcytic anemia and establishing relations between the laboratorial characteristics of the diseases. The study had the participation of 427 children, aged between 6 and 9 years old, being 235 female and 192 male students from Municipal and State Schools in the north area of Ribeirão Preto-SP. It analyzed: a) number of erythrocytes and leucocytes, hemoglobin concentration, hematocrit, red cell indices and red cell distribution width (automatic counter Micros 45 – Horiba ABX®) and calculation of the mathematical index RDWI; b) plasma lead levels (inductively coupled plasma mass spectrometer VG PlasmaQuad PQII®) and study of the deletions of the polymorphisms of the enzyme ALAD, by PCR; c) iron status by serum ferritin levels (immunochemiluminescence using the kit Ferritin Immulite – DPC® and the equipment Immulite 1 - DPC®), soluble transferrin receptor (enzyme immune assay, using the kit Quantikine soluble transferrin receptor of R&D Systems® and the microplate reader ELISA READER 210, model Microwell System Organon Teknika®) and calculation of the sTfR/log ferritin index; d) hemoglobin analysis by electrophoresis on cellulose acetate at alkaline pH, HPLC (automated system Variant II Bio-Rad® and the kit “ β -thalassemia Short Program) and PCR for the main deletion of α -thalassemias. Based on the WHO criteria by to define anemia (Hb under 11.5 g/dL), it was verified that 75 (17.6%) children were anemic, being 33 (44%) with hemoglobinopathy, 29 (38.6%) with anemia of unknown causes and 13 (17.4%) with iron deficiency anemia. Among the anemias, only 14 were hypochromic microcytic, 10 (71.4%) being some sort of hemoglobinopathy, 2 (14.2%) due to iron deficiency and 2 (14.2%) due to unknown causes. In the studied population, the prevalence of hemoglobinopathies was 16.6%, namely: 11.6% with α -thalassemia; 4% with Hb F elevated; 3.5% with Hb AS; 2.8% with β -thalassemia; 0.96% with α/β -thalassemia and 0.24% with Hb AC. The plasma lead levels, in all participants of the study, were within the levels recommended by the Center for Disease Control and Prevention (< 10 $\mu\text{g/dL}$), without the interference of the metal in the pathogenesis of the anemias. There was no significant association between the polymorphisms of the ALAD-1 (ALAD1-1 and ALAD1-2) and the plasma lead levels. Iron deficiency anemia was diagnosed in 3% of the children and ID in 6.1%, using a cutoff of 30ng/mL for serum ferritin. There was agreement in the identification of hemoglobinopathies using the methodologies electrophoresis of hemoglobin in cellulose acetate and the HPLC, as these methodologies are not useful to diagnose α -thalassemia. In order to identify the carriers of α -thalassemia gene deletion ($-\alpha 3,7$) it is necessary to use the molecular analysis (PCR). The suspicion of Hb S/ β -thalassemia identified by HPLC must be confirmed through the analysis of the parents and/or siblings. The ferritin was a good parameter to identify ID early and useful to differ the carriers of hemoglobinopathies of the carriers of ID and IDA. The sTfR/log ferritin level was more sensitive than the sTfR, in the differentiation of ID and thalassemia. In the diagnosis of the hypochromic microcytic anemias, it is necessary to analyze a set of determinations, including hematological exam, iron status, electrophoretic profile, in some

cases including relatives, and molecular analysis of the hemoglobinopathies.

Comissão: Ana Maria de Souza
Amauri Antiquera Leite
Carlos Alberto Nogueira de Almeida
Harnôldo Colares Coêlho
Jose Edson Paz da Silva

Aluno: Eduardo Carneiro Clímaco

Orientador: Ana Lucia da Costa Darini

Defesa: 19/08/2011

Título: Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

Title: Molecular evaluation of the mechanisms that determine antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp.

Resumo: *P. aeruginosa* e espécies de *Acinetobacter* são causas comuns de diversas infecções em pacientes hospitalizados, principalmente nos internados em centros de tratamento intensivo. Além disso, esses microrganismos se destacam por apresentarem resistência, intrínseca e adquirida, a várias classes de antibióticos, conferindo à bactéria fenótipos de multirresistência e panresistência. O objetivo deste estudo foi avaliar a participação de integrons (elementos genéticos que carregam genes de resistência), de genes codificadores de metalo--lactamases, da perda de porinas (canais protéicos da membrana externa), e da atividade de efluxo aumentada, como determinantes do fenótipo de multirresistência e panresistência. Foram estudadas 147 *P. aeruginosa* e 57 *Acinetobacter* spp. isolados de pacientes hospitalizados no Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora, no período de 2003 a 2006. O perfil de sensibilidade destes isolados foi determinado por disco de difusão e utilizado para classificá-las como multirresistentes (MDR) e não multirresistentes (n-MDR). A variabilidade clonal dos isolados foi investigada por PFGE. Os isolados pertencentes aos grupos MDR e n-MDR foram investigados quanto a presença de integrons de classe 1, 2 e 3, por PCR e análise de RFLP. Os cassetes gênicos contidos nestes integrons, assim como genes codificadores de carbapenemases (ex. IMP, VIM e SPM), foram detectados por PCR e identificados por seqüenciamento. Avaliação da expressão gênica de bombas de efluxo (*mexB*, *mexY*, *mexD* e *adeB*) e de porina (*OprD*) foi conduzida por real-time RT-PCR. Os dados apresentados para os isolados do grupo MDR foram comparados àqueles do grupo n-MDR e a associação entre os determinantes de resistência e o fenótipo MDR foi calculada estatisticamente. Fenótipo de multiresistência foi observado em 42,2% e 84,2% das *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. estudadas. Nenhum isolado bacteriano apresentou fenótipo panresistente. Em 65 (44,2%) dos isolados de *P. aeruginosa*, foram detectados integrons de classe 1. Esses elementos apresentaram relação estatisticamente significativa com fenótipos MDR em *P. aeruginosa*. Entretanto, a maioria desses integrons não carregava nenhum cassete gênico (43/65) ou continham apenas cassetes gênicos de resistência a aminoglicosídeos (19/65). Entre os isolados de *Acinetobacter* spp., 11 (17,5%) apresentaram integrons de classe 1 e 30 (47,6%) integrons de classe 2. Apenas os últimos foram estatisticamente associados com fenótipos MDR. A pesquisa de metalo--lactamase (MBL) revelou a produção de enzimas SPM em 24 isolados de *P. aeruginosa*. Os estudos de expressão gênica demonstraram que, entre os sistemas de efluxo mais relatados para *P. aeruginosa*, MexXY-OprM foi o que mostrou maior diferença entre o nível de expressão dos grupos MDR e n-MDR, sugerindo que este sistema de efluxo desempenha importante papel no fenótipo MDR. Diminuição, em média de 66,4%, da produção de *OprD* também foi um padrão encontrado nos isolados MDR em relação aos n-MDR. Dois grupos clonais de *P. aeruginosa* e dois de *Acinetobacter* spp. foram predominantes e tiveram relação com presença de integrons, produção de SPM-1 e com fenótipo MDR. Portanto, esse fenótipo pode ser consequência de acúmulo de determinantes de resistência em clones específicos.

Summary: The non-fermenting pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. are important causes of nosocomial infections. These species are often associated with a multidrug resistance (MDR) phenotype, due to intrinsic and acquired resistance genes. Some determinants of resistance, such as integrons, carbapenemases, overexpression of efflux systems and porins loss may be associated with the MDR phenotype. The aim of this study was to evaluate the association of non-MDR and MDR phenotypes in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. to the presence of integrons and carbapenemases encoding genes, the overexpression of *mexY*, *mexB*, *mexD* and *adeB* genes and loss of the outer membrane protein, *OprD*. These resistance determinants were evaluated in 147 *P. aeruginosa* and 57

Acinetobacter spp., isolated from in-patients of University Hospital of UFJF. Isolates with different PFGE and non-susceptibility profiles were grouped according to MDR or non-MDR phenotypes. PCR and real-time RT-PCR were used to investigate the presence of class 1, 2 and 3 integrons and carbapenemase encoding genes and the expression of *mexY*, *mexB*, *mexD* and *adeB* efflux pumps and *OprD* porin, respectively. Class 1 integrons were one of the most common genetic elements present in MDR *P. aeruginosa* (44,2%), but the phenotype could not be attributed to these elements, since they showed empty (43/65) or only aminoglycoside gene cassettes (19/65). Class 2 integrons were the most common genetic elements in MDR *Acinetobacter* spp., and this association was statistically significant. SPM encoding gene was the only carbapenemase gene found in *P. aeruginosa* and, predominantly, in the PFGE cluster A. Expression of *MexXY-OprM* determined by real-time RT-PCR was the highest variable between MDR and non-MDR *P. aeruginosa* isolates (almost 10-fold). Reduction of 66.4% in *OprD* expression was observed in MDR *P. aeruginosa*, in comparison with non-MDR ones. It is concluded that the most important genetic determinants in the MDR phenotype of *P. aeruginosa* were SPM-1 production, followed by *MexXY-OprM* over expression and diminished production of *OprD*, while class 2 integrons was the most important genetic determinant of MDR phenotype in *A. baumannii*.

Comissão: Ana Lucia da Costa Darini
Juliana Pfrimer Falcão
Nilton Erbet Lincopan Huenuman
Luisa Maria Sobreira Vieira Peixe
Fernando Bellissimo Rodrigues

Aluno: Flávia Aparecida Paina

Orientador: Ana Maria de Souza

Defesa: 28/06/2011

Título: Efeitos da clofazimina e claritromicina sobre os sistemas hematológico, hemostático e bioquímico de ratos Wistar

Title: Clofazimine and clarithromycin effects on the hematological, hemostatic and biochemical systems of Wistar rats

Resumo: Claritromicina e clofazimina são utilizadas no tratamento da hanseníase e em infecções causadas pelo complexo *Mycobacterium avium*, comuns em portadores do HIV. Devido à escassez de dados sobre a toxicidade de esquemas terapêuticos que associam estes fármacos, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos adversos desta terapia, em ratos machos Wistar, por meio da determinação de parâmetros hematológicos, hemostáticos e bioquímicos e correlação destes parâmetros com a dose e concentração plasmática dos medicamentos, em regime de doses únicas e múltiplas. Para tanto foram realizados: a) contagem global e específica de leucócitos (método manual) e ensaios de fagocitose e *burst* oxidativo de neutrófilos (citometria de fluxo); b) contagem de plaquetas (método manual), tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, níveis plasmáticos dos fatores VII e X (método automatizado); c) níveis séricos de gama-glutamiltransferase (método cinéticocolorimétrico) e bilirrubinas total e direta (método colorimétrico); d) concentrações plasmáticas dos fármacos (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Não houve diferenças entre as concentrações plasmáticas dos fármacos administrados em monoterapia ou politerapia. Entretanto, tanto clofazimina como claritromicina tiveram redução das concentrações plasmáticas em regime de doses múltiplas, quando comparadas à dose única. Houve aumento do número de leucócitos (dose múltipla) e de células polimorfonucleares (doses única e múltipla) nos grupos tratados com claritromicina em monoterapia ou associada à clofazimina, e redução das células mononucleares, em doses única e múltipla, nos mesmos grupos. Os fármacos parecem inverter a proporção entre células mono e polimorfonucleares. Observou-se aumento do *burst* oxidativo nos animais tratados com os fármacos tanto em monoterapia como em regime de politerapia. Entretanto, não houve diferença entre os tratamentos com os fármacos em relação ao controle DMSO, em dose única. Em doses múltiplas, os tratamentos com clofazimina e claritromicina em monoterapia ou politerapia estimularam o aumento do *burst* oxidativo ($p < 0,0001$) em relação ao controle DMSO. Não foram verificadas diferenças na fagocitose entre os grupos tratados e controle, tanto em dose única como em doses múltiplas. Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada não foram alterados com o uso dos fármacos. Os fatores VII e X da coagulação tiveram aumento de suas atividades quando os ratos foram tratados em regime de dose múltipla com claritromicina, em regime de mono e politerapia. Houve perda de cerca de 8 % do peso de ratos tratados com clofazimina e 18 % daqueles tratados com claritromicina ou com a associação dos dois fármacos, no esquema de doses múltiplas, entretanto não houve diferença entre os grupos quando foram avaliados os níveis de gama-glutamiltransferase e bilirrubinas total e direta. Concluindo, clofazimina e claritromicina provocam alterações hematológicas, hemostáticas e bioquímicas e os resultados de concentração plasmática são valiosos para avaliação de efeitos adversos em estudos comparativos de monoterapia e politerapia entre os medicamentos.

Summary: Clarithromycin and clofazimine have been used to treat leprosy and infections caused by *Mycobacterium avium* complex in HIV patients. Because there are few data about the toxicity of treatment regimens involving these drugs, this study aimed to evaluate the adverse effects of this therapy in male Wistar rats through the determination of hematological, haemostatic and biochemical parameters and correlate them with the dose and plasma concentrations of drugs, under a single and multiple dose regimen. Evaluation was performed as follows: a) Global and specific count of leukocytes (manual method), phagocytosis and oxidative burst of neutrophils assays (flow cytometry), b) platelet count (manual method), prothrombin time, activated partial thromboplastin time, plasma levels of factors VII and X (automated method), c) Gamma-glutamyltransferase (kinetic-colorimetric method) and total and direct bilirubin serum levels (colorimetric method), d) plasma concentrations of drugs (High-Performance

Liquid Chromatography). There were no differences between plasma concentrations of the drugs administered in monotherapy or polytherapy. However, the concentrations of both clofazimine and clarithromycin have decreased in plasma in multiple dose regimen compared to single dose. There was an increase in the number of leukocytes (multiple dose) and polymorphonuclear cells (single and multiple doses) in the groups treated with clarithromycin in monotherapy or in association with clofazimine, and a decrease in the number of mononuclear cells in single and multiple doses, in the same groups. Both drugs seemed to reverse the proportion between mononuclear and polymorphonuclear cells. The oxidative burst was observed in animals treated with drugs in polytherapy or in monotherapy, however there was no difference between the treatment with drugs and the control with DMSO in single dose. In multiple doses, treatment with clofazimine and clarithromycin in monotherapy or polytherapy stimulated the increase of oxidative burst ($p < 0.0001$) compared to control. There were no differences in phagocytosis between the treated and control groups in single and multiple doses. Prothrombin time and activated partial thromboplastin time have not changed with the use drugs. In contrast, the activities of factors VII and X of coagulation have increased when rats were treated with multiple doses regimes with clarithromycin alone or in association with clofazimine. There was weight loss of 8% in rats treated with clofazimine and 18% in those treated with clarithromycin or with association of the drugs in the multiple doses regimen. However, there was no difference between the groups when gammaglutamyltransferase and total and direct bilirubin levels were analyzed. Therefore, clofazimine and clarithromycin induce hematological, hemostatic and biochemical changes and the results of plasma concentration is valuable for assessing adverse effects in comparative studies of monotherapy and polytherapy of these drugs.

Comissão: Ana Maria de Souza
Cleni Mara Marzocchi Machado
Elvira Maria Guerra Shinohara
Iracilda Zeppone Carlos
Wilson Roberto Malfará

Aluno: Leonardo Neves de Andrade

Orientador: Ana Lucia da Costa Darini

Defesa: 14/10/2011

Título: Genética e epidemiologia molecular de enterobactérias produtoras de KPC no Brasil.

Title: Genetic and molecular epidemiology of KPC-producing enterobacteria in Brazil.

Título: Genética y epidemiología molecular de enterobacterias productoras de KPC en Brazil.

Resumo: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases) são β -lactamases da classe A de Ambler globalmente disseminadas, com 10 variantes, sendo predominantes KPC-2 e KPC-3. O objetivo deste trabalho foi estudar a genética e epidemiologia molecular de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos isoladas no Brasil. Sessenta e quatro enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos foram analisadas: 57 *Klebsiella pneumoniae* (Kp), 5 *Enterobacter cloacae* (Ecl), 1 *Serratia marcescens* (Sm) e 1 *Citrobacter freundii* (Cf), de diferentes pacientes, em seis hospitais e em duas distintas regiões do Brasil. Identificação e testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados por sistemas semi-automáticos e métodos padronizados. A relação clonal foi estabelecida por Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) e também por tipagem por sequenciamento de multilocus no caso de *K. pneumoniae*. A presença de genes que codificam carbapenemases e β -lactamases de espectro estendido foi pesquisada. A caracterização de blaKPC-2, do ambiente genético e de plasmídeos incluiu PCR e sequenciamento, análises de RFLP, S1-PFGE e hibridação. Os isolados Kp corresponderam a 5 pulsotipos, por PFGE, ligados a 6 tipos de sequência (ST): KpA-ST258 (n = 51 com 6 subtipos), KpA6-ST11 (n = 1), KpB-ST327 (n = 1), KpC-ST44 (n = 2), KpD-ST437 (n = 1) e KpE-ST48 (n = 1). Ecl foram agrupados em clones α e β , Sm e Cf representam um clone cada. Todos os isolados foram resistentes aos β -lactâmicos, sensíveis à colistina e tigeciclina e mostraram fenótipos variáveis contra aminoglicosídeos, quinolonas, nitrofurantoína e sulfametoxazol-trimetoprim. Heterorresistência a carbapenêmicos foi observada para isolados de Kp e Cf, conforme relatado anteriormente com produtores de KPC-2 e VIM. Esse estudo relata a disseminação do gene blaKPC-2 nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro facilitada por clones de *K. pneumoniae* pertencentes ao globalmente disseminado Complexo Clonal CC258 (ST258, ST437 e ST11) e uma diversidade de plasmídeos (IncFII-KpA, IncN-Kp e Ecl β , IncL/M-Sm e Cf e, dois plasmídeos não-tipáveis carregando Tn4401a ou Tn4401b) disseminados com sucesso entre as enterobactérias. Constitui também a primeira descrição do ST258 no Brasil associada a um surto em um hospital universitário da cidade de Ribeirão Preto. Este trabalho apontou a alta diversidade de elementos genéticos disponíveis abrigoando blaKPC-2. Isso poderia ampliar enormemente a disseminação desse gene no Brasil como também no continente.

Summary: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases) are globally spread β -lactamases of the Ambler class A comprising 10 variants, KPC-2 and KPC-3 being predominant. The objective of this work was study the genetic and molecular epidemiology of carbapenem resistant enterobacterial isolates in Brazil. Sixty-four carbapenem resistant isolates were analyzed: 57 *Klebsiella pneumoniae* (Kp), 5 *Enterobacter cloacae* (Ecl), 1 *Serratia marcescens* (Sm) and 1 *Citrobacter freundii* (Cf) from different patients at six hospitals in two different Brazilian regions. Identification and antimicrobial susceptibility testing were accomplished by using semiautomatic systems and standard methods. Clonal relatedness was established by Pulsed- Field Gel Electrophoresis (PFGE) and also by multilocus sequence typing in the case *K. pneumoniae* isolates. The presence of genes encoding carbapenemases and extended spectrum β -lactamases was searched. Characterization of blaKPC-2, genetic environment and plasmids included PCR and further sequencing, RFLP analyses, S1-PFGE and hybridization. The Kp isolates corresponded to 5 PFGE types linked to 6 sequence types (ST): KpA-ST258 (n=51 comprising 6 subtypes), KpA6-ST11 (n=1), KpB-ST327 (n=1), KpC-ST44 (n=2), KpD-ST437 (n=1) and KpE-ST48 (n=1). Ecl isolates were grouped in α and β clones and, Sm and Cf represent one clone each. All isolates were resistant to β -lactams, susceptible to colistin and tigecycline and showed variable phenotype against aminoglycosides, quinolones, nitrofurantoin and trimethoprim-sulfamethoxazole.

Heteroresistance to carbapenems was observed for Kp and Cf isolates, as previously reported to KPC-2 and VIM producers. This study reports the spread of blaKPC-2 in Sao Paulo and Rio de Janeiro states facilitated by globally spread CC258-K. pneumoniae clones (ST258, ST11, ST437) and a diversity of plasmids (IncFII-KpA, IncN-Kp and Ecl β , IncL/M-Sm and Cf and, two untypeable plasmids carrying Tn4401a or Tn4401b) successfully disseminated among Enterobacteriaceae species. It also constitutes the first description of ST258 in Brazil which was associated with a hospital outbreak in Ribeirao Preto city. This work pointed out the high diversity of available genetic elements harboring blaKPC-2. This might greatly amplify the dissemination of KPC genetic in Brazil and within of the South America continent.

Resumen: KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemasas) son β -lactamasas de clase A de Ambler diseminadas a nivel mundial, con 10 variantes, siendo predominantes KPC-2 y KPC-3. El objetivo de este trabajo fue estudiar la genética y la epidemiología molecular de las enterobacterias resistentes a carbapenemas aisladas en Brasil. Sesenta y cuatro enterobacterias resistentes a los carbapenemas fueron analizadas: 57 Klebsiella pneumoniae (Kp), 5 Enterobacter cloacae (Ecl), una Serratia marcescens (Sm) y Citrobacter freundii (Cf) de diferentes pacientes de seis hospitales y dos regiones diferentes de Brasil. Pruebas de identificación y susceptibilidad antimicrobiana se realizaron con métodos semi-automáticos y estándares. La relación clonal se estableció mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y por secuenciación de multilocus en el caso de K. pneumoniae. Se investigó la presencia de genes que codifican las carbapenemasas y β -lactamasas de amplio espectro. La caracterización de blaKPC-2, el entorno genético y plásmidos incluyeron PCR y secuenciación, RFLP, S1-PFGE e hibridación. Aislados de Kp correspondieron a cinco pulsotipos por PFGE, asociados a seis secuencias tipos (ST): KPA-ST258 (n = 51 con 6 subtipos), KpA6-ST11 (n = 1), KPB-ST327 (n = 1), KPC-ST44 (n = 2), ST437-KPD (n = 1) y KPE-ST48 (n = 1). Clones Ecl se agruparon en α y β y, Sm y Cf representaron un clon cada uno. Todos los aislados fueron resistentes a los β -lactámicos, sensibles a la colistina y la tigeciclina y mostraron variable fenotipo contra los aminoglucósidos, quinolonas, nitrofurantoína y trimetoprim sulfametoxazol. Se observó heteroresistencia a los carbapenemas en los aislados de Kp y Cf, como previamente descrito para aislados productores de KPC-2 y VIM. Este estudio describe la diseminación del gen blaKPC-2 en los estados de Sao Paulo y Rio de Janeiro facilitada por clones de K. pneumoniae pertenecientes al complejo clonal CC258 (ST258, ST437 y ST11) ampliamente diseminado a nivel mundial y por una diversidad de plásmidos (IncFII-KpA, IncN-Kp y Ecl β , IncL/M-Sm y Cf y, dos plásmidos no tipables portando Tn4401a y Tn4401b) difundidos con éxito entre las enterobacterias. También es la primera descripción de Kp-ST258 en Brasil relacionado con un brote en un hospital universitario en la ciudad de Ribeirão Preto. Esto podría amplificar en gran medida la diseminación de este gen en Brasil y dentro del continente Sudamericano.

Comissão: Ana Lucia da Costa Darini
Carlos Emilio Levy
Clarice Queico Fujimura Leite
Juliana Pfrimer Falcão
Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

Aluno: Raquel Tognon Ribeiro

Orientador: Fabíola Attié de Castro

Defesa: 11/10/2011

Título: Alterações da expressão de apoptomirs, de genes e proteínas pró- e anti-apoptóticos em Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.

Title: Deregulated expression of apoptomirs and apoptosis-related genes and proteins in Primary Myelofibrosis and Essential Thrombocythemia.

Resumo: As Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas (NMPC) – Trombocitemia Essencial (TE), Mielofibrose (MF) - são desordens hematopoéticas resultantes da expansão clonal da célula tronco hematopoética alterada. Essas doenças caracterizam-se pela independência dos progenitores hematopoéticos aos estímulos dos fatores de crescimento e citocinas e pela proliferação exacerbada das células da linhagem mielóide com maturação preservada. Os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na patogênese e progressão da TE e MF não foram ainda esclarecidos, mas o mieloacúmulo presente nessas doenças parece estar associado à alteração de proliferação e apoptose celular. Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar em células CD34+ da medula óssea e leucócitos dos pacientes com TE e MF: (1) a expressão de apoptomirs e de genes pró- e anti-apoptóticos pertencentes à via intrínseca e extrínseca da apoptose pela metodologia de RT-PCR em tempo real; (2) expressão de proteínas pró- e anti-apoptóticas por Western-blot; (3) o perfil de sensibilidade das células mononucleares à apoptose induzida por diferentes agentes apoptogênicos pela técnica de citometria de fluxo e (4) correlacionar os resultados obtidos com dados clínico-laboratoriais dos pacientes e com a expressão do gene PRV-1. Em TE, nas células CD34+, foi detectado aumento da expressão de a1, mcl-1, bid, bok e noxa e diminuição de bax em relação aos controles. Nos leucócitos, foi detectada a elevação da expressão de a1, bcl-2, bcl-w e bcl-xL, bad e bok e diminuição de bid e bimEL. Em comparação com o grupo controle, os pacientes com MF apresentaram maior expressão dos genes a1, bcl-w, bak, bok e noxa e menor de bcl-2 nas células CD34+. Nos leucócitos dos pacientes com MF foi verificado aumento da expressão dos genes bcl-2, bcl-w e bcl-xL, bad e bok. O c-iap-1 apresentou maior expressão nas células CD34+ dos pacientes com MF e TE, enquanto que o c-iap-2 estava elevado nos leucócitos e células CD34+. Foi ainda detectada a expressão diferencial em TE e MF dos genes pertencentes a via de receptor de morte, como a maior expressão dos genes fas, fas-L, faim e dr4 nas células CD34+ dos pacientes e menor expressão do fas-L e trail nos leucócitos dos pacientes com TE e MF. Os resultados indicaram associação da expressão do gene PRV-1 com a mutação JAK2V617F e com a expressão dos genes a1, bcl-w, bik, bax, c-iap-2 e trail. Com relação à expressão proteica, BCL-XL estava aumentada e TRAIL diminuída em leucócitos de pacientes com MF enquanto que a molécula BID estava diminuída em leucócitos de pacientes com TE. Os miRNA26a, let 7d e miR15a estavam mais expressos nos leucócitos de pacientes com TE e MF. Em pacientes com TE o miR130b estava elevado e o miR16 diminuído, enquanto que nos pacientes com MF o miR198 estava aumentado. Os linfócitos dos pacientes com TE e MF apresentaram maior resistência à apoptose estimulada por: actinomicina, etoposídeo, teniposídeo, citarabina e estaurosporina do que os linfócitos dos controles. Em conclusão, os dados obtidos sugerem a ligação da alteração do processo de apoptose celular, com a expressão do gene PRV-1 e status da mutação JAK2V617F. Esses resultados contribuem para o melhor entendimento da fisiopatologia das NMPC visto que associam a fisiopatologia da TE e MF com a resistência das células alteradas à apoptose. Essas informações serão úteis no futuro, possibilitando o desenho de novos alvos terapêuticos e a descrição de novos marcadores de prognóstico.

Summary: Chronic Myeloproliferative Neoplasms (cMPN) - Essential Thrombocythemia (ET), Primary Myelofibrosis (PMF) and Polycythemia Vera (PV) - are clonal hematopoietic stem cell malignancies characterized by an accumulation of mature myeloid cells in bone marrow and peripheral blood. It seems that apoptotic machinery deregulation contribute to ET and PMF pathogenesis. Despite the advances in the molecular knowledge, the physiopathology of

these diseases remains unknown. This study investigated cellular and molecular mechanisms involved in apoptosis process regulation in bone marrow haematopoietic progenitor CD34+ cells and leukocytes from ET and PMF patients. The specific aims were: (1) to evaluate death receptor's family members and Bcl-2 related genes expression as well apoptosis-related microRNAs by Real Time PCR; (2) apoptosis-related protein expression by Western Blot; (3) assess mononuclear cells apoptosis resistance by flow cytometry and (4) to correlate the results with JAK2V617F mutation, PRV-1 gene expression and as well clinical data. In ET CD34+ cells, we found overexpression of *a1*, *mcl-1*, *bid*, *bok* e *nox* and a decrease of *bax* compared to controls, while in leukocytes *a1*, *bcl-2*, *bcl-w* e *bcl-xL*, *bad* e *bok* expression was increased and *bid* and *bimEL* expression was lower than in controls. In PMF, *a1*, *bcl-w*, *bak*, *bok* e *nox* were overexpressed and *bcl-2* downregulated in CD34+ cells. In PMF leukocytes *bcl-2*, *bcl-w* e *bcl-xL*, *bad* e *bok* mRNA levels were increased. *c-iap-1* was increased in ET and PMF CD34+ cells and *c-iap-2* expression elevated in ET and PMF CD34+ cells and leukocytes. Death receptor related genes showed overexpression of *fas*, *fas-L*, *faim* and *dr4* in patients' CD34+ cells and downregulation of *fas-L* and *trail* in ET and PMF leukocytes. We found differential expression of several genes between patients JAK2V617F positive and negative, as well we found correlation between gene expression and JAK2V617F allele burden, white blood cells and platelets count and splenomegaly. PRV-1 gene was overexpressed in ET and PMF leukocytes and showed correlation with JAK2V617F mutation and *a1*, *bcl-w*, *bik*, *bax*, *c-iap-2* and *trail* gene expression. Regarding protein expression, BCL-XL was increased and TRAIL decreased in PMF leukocytes and BID was decreased in ET leukocytes. miRNA26a, let 7d e miR15a was overexpressed in ET and PMF leukocytes, while miR130b was increased only in ET and miR198 only in PMF. miR16 was downregulated in ET leukocytes comparing to controls. We also detected a resistance to apoptosis-inducers in ET and PMF lymphocytes and we observed correlation between apoptosis percentage and the expression of many studied genes. In conclusion, the results indicate the participations of Bcl-2 family genes and Death Receptor pathway genes, as well PRV-1 and JAK2V617F mutation in these disorders, which contribute to elucidate cMPN physiopathology and might lead to the discovery of new cMPN therapies and molecular markers.

Comissão: Andréia Machado Leopoldino
Eduardo Magalhães Rego
Fabíola Attié de Castro
Jacqueline de Fátima Jacysyn
Katia Borgia Barbosa Pagnano

Aluno: Vanessa Danielle Menjon Müller

Orientador: Victor Hugo Aquino Quintana

Defesa: 12/05/2011

Título: Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela

Title: Evaluation of antiviral activity of snake and scorpion venoms against dengue and yellow fever virus

Resumo: A dengue é a mais importante arbovirose no mundo; aproximadamente 50 milhões de infecções ocorrem anualmente acarretando 500.000 casos de dengue hemorrágica e 22.000 mortes. A febre amarela é uma doença hemorrágica viral com elevada mortalidade que é transmitida por mosquitos. Vacinas eficazes contra a febre amarela já estão disponíveis há quase 70 anos e são responsáveis por uma redução significativa de ocorrências da doença no mundo, no entanto, cerca de 200.000 casos de febre amarela ainda ocorrem anualmente, principalmente na África. Dessa forma, o desenvolvimento de fármacos antivirais contra essas viroses é uma prioridade de saúde pública. Os produtos naturais sejam de origem vegetal ou animal, possuem uma extensa diversidade química, sendo uma fonte inesgotável de compostos com promissoras atividades biológicas. No Brasil, é grande a incidência de animais venenosos ou peçonhentos, tais como serpentes, sapos e escorpiões. Os venenos desses animais são fontes de diversas substâncias químicas que ainda não possuem a sua atividade biológica e farmacológica completamente estudada. Neste trabalho avaliamos a potencial ação antiviral de peçonhas de serpentes (*Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops pirajai*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops brasili* e *Bothrops fonseca*) e escorpião (*Tityus serrulatus*) contra os vírus da febre amarela e dengue usando diferentes estratégias metodológicas (pré-tratamento, pós-tratamento, virucida, adsorção e internalização). Primeiramente realizamos um screening com as peçonhas brutas, observando que a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* inibiu a replicação viral apresentando os maiores índices de seletividade (IS). Crotoxina, crotamina, crotapotina, convulxina, giroxina, PLA2-CB e PLA2-IC, isoladas de *Crotalus durissus terrificus*, foram então testadas nas diferentes estratégias metodológicas contra os vírus dengue e febre amarela. Foi possível verificar que crotoxina, PLA2-CB e PLA2-IC inibiram a replicação viral com altos índices de seletividade (IS). A ação verificada ocorreu na fase inicial do ciclo de replicação viral (pré-tratamento, virucida, adsorção). A ação antiviral verificada neste estudo foi atribuída a ação da PLA2, visto que a crotoxina é um complexo protéico composto pela crotapotina e pela PLA2-CB. Posteriormente avaliamos uma fosfolipase sem atividade catalítica isolada de *Bothrops jararacussu*, a BthTX-I. Essa fosfolipase apresentou baixa inibição da replicação viral, sugerindo que a atividade catalítica da fosfolipase é importante, mas possivelmente não a única responsável pela ação antiviral. Os resultados obtidos permitem sugerir também que as fosfolipases apresentam ação tanto sobre a partícula viral quanto sobre receptores celulares, o que justifica os altos índices de seletividade observados.

Summary: Dengue is the most important arbovirus disease in the world; nearly 50 million infections occur annually resulting in 500,000 cases of DHF and 22,000 deaths. Yellow fever is a viral haemorrhagic fever with high mortality that is transmitted by mosquitoes. Effective vaccines against yellow fever have been available for almost 70 years and are responsible for a significant reduction of the disease worldwide. However, about 200,000 cases of yellow fever still occur annually, mainly in Africa. Thus, the development of antiviral drugs against these viruses is a public health priority. Natural products of plant or animal origin have an extensive chemical diversity, and an inexhaustible source of compounds with promising biological activities. In Brazil, there is a high incidence of poisonous or venomous animals such as snakes, frogs and scorpions occur. The venoms of these animals are a source of several chemicals that does not possess biological and pharmacological activity completely studied. In this study, we assess the potential antiviral action of snake venom (*Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops pirajai*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops brasili* and *Bothrops fonseca*) and Scorpion (*Tityus serrulatus*) against yellow fever and dengue viruses using different methodological strategies (pre-treatment, post-treatment,

virucidal, adsorption and internalization). First, we performed a screening with the crude venoms, founding that the venom of *Crotalus durissus terrificus* inhibited viral replication showing the highest selectivity index (SI). Crotoxin, crotoxin, crotoxin, convulxin, gyroxin, PLA2-CB and PLA2-IC isolated from *Crotalus durissus terrificus*, were then tested in the different methodological strategies against dengue and yellow fever viruses. We found that crotoxin, PLA2-CB and PLA2-IC inhibited viral replication with high SI. The action of these compounds against the virus was at the first steps of the replication cycle (pre-treatment, virucidal, adsorption). The antiviral action observed in this study was attributed to the action of PLA2, since crotoxin is a protein complex composed of crotoxin and PLA2-CB. Afterwards, we evaluated a phospholipase without catalytic activity isolated from *Bothrops jararacussu*, the BthTX-I. This phospholipase showed low inhibition of viral replication, showing that the catalytic activity of phospholipase is important, but perhaps not the only one responsible for the antiviral action. Our results also suggest that phospholipases have action on the viral particle and on cell receptors, which explains the high levels of selectivity observed.

Comissão: Victor Hugo Aquino Quintana
Eliane Candiani Arantes Braga
Benedito Antonio Lopes da Fonseca
Paulo Roberto Wunder
Aparecida Yulie Yamamoto