



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

DOUTORADO – 2012

Aluno: **Aline Fernanda Ferreira**

Orientador: Fabíola Attié de Castro

Defesa: 25/05/2012

Título: Expressão de microRNAs em células Bcr-Abl1 positivas: associação com a resistência à apoptose e fisiopatologia da Leucemia Mielóide Crônica

Title: MicroRNA expression in Bcr-Abl1 positive cells: association with apoptosis resistance and Chronic Myeloid Leukemia physiopathology

Título: MicroRNA expression in Bcr-Abl1 positive cells: association with apoptosis resistance and Chronic Myeloid Leukemia physiopathology

Resumo: A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa resultante da expansão clonal da célula hematopoética precursora. Sua fisiopatologia está associada ao cromossomo (cr) Philadelphia (Ph) originado da t(9;22) e ao oncogene bcr-abl1 que codifica a proteína Bcr-Abl1 com constitutiva atividade de tirosinoquinase (TK). A expressão de Bcr-Abl determina a leucemogênese por meio da alteração da adesão das células progenitoras leucêmicas ao estroma medular e resistência à apoptose. Os inibidores de TK, o mesilato de imatinibe, dasatinibe e nilotinibe são utilizados no tratamento da LMC, entretanto, casos de resistência têm sido relacionados à presença de mutações em Bcr-Abl1, duplicação do cr Ph e superexpressão do gene bcr-abl1. A resistência ou refratariedade de alguns pacientes ao tratamento com inibidores de TK impulsiona a realização de estudos para melhor conhecimento da fisiopatologia da LMC e descrição de novos alvos terapêuticos. Nesse contexto, o presente estudo investigou a participação de microRNAs na modulação da expressão de genes que regulam a apoptose. O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito de bcr-abl1 e da atividade tirosinoquinase de Bcr-abl na expressão desses miRNAs em linhagens celulares e pacientes com LMC. O RNA das linhagens celulares, de pacientes e controles foram obtidos por meio da extração com Trizol® e o cDNA sintetizado com o kit High Capacity cDNA reverse transcription. A expressão dos microRNAs e dos genes alvos foi quantificada por PCR em tempo real utilizando o kit SYBR Green PCR Master Mix® e TaqMan Universal PCR Master Mix®. A inibição de Bcr-Abl1 na linhagem HL-60.Bcr-Abl1 tratada com o mesilato de imatinibe aumentou a expressão de miR-let-7d, miR-15a, miR-130a e miR-145 e diminuiu os níveis de miR-21. O tratamento com dasatinibe aumentou a expressão de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-30e, miR-130a e miR-142-3p. O nilotinibe aumentou a expressão de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-130a e miR-145 e, diminuiu os níveis de miR-let-7d e miR-21. Os resultados obtidos da análise entre os de pacientes com LMC em diferentes fases da doença mostraram elevados níveis de miR-15a, miR-130b e miR-145 em pacientes na fase crônica versus controles e baixos níveis de miR-16, miR-26a e miR-146a. Pacientes em fases avançadas versus controles apresentaram baixa expressão de miR-let-7d, miR-16, miR-142-3p, miR-145 e miR-146a. Baixos níveis de miR-let-7d, miR-15a, miR-16, miR-29c, miR-142-3p, miR-145 e miR-146a foram observados nas fases avançadas da LMC em relação a fase crônica. Os genes anti-apoptóticos a1, bcl-2, c-flip, ciap-1 e ciap-2 estavam mais elevados na fase crônica do que nos controles. A expressão do gene c-flip estava diminuída e dos genes a1, ciap-1 e mcl-1 aumentada nas fases avançadas em relação aos controles e a fase crônica. Pacientes com LMC resistentes ao MI apresentaram menores níveis de miR-26a, miR-29c, miR-130b, miR-146a e dos genes anti-apoptóticos ciap-1 e mcl-1. Os dados obtidos sugerem que a TK Bcr-Abl modula a expressão de microRNAs que possuem como alvos genes que regulam a apoptose celular.

Summary: Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disease resulting from clonal expansion of hematopoietic precursor cells. Its physiopathology is associated to Philadelphia (Ph) chromosome (cr) originated from the t(9;22) and bcr-abl1 oncogene that encodes the Bcr-Abl protein with constitutive tyrosine kinase activity (TK). The Bcr-Abl1 expression determines leukemogenesis by altering the leukemic progenitor cells' adhesion by bone marrow stroma and apoptosis resistance. TK inhibitors imatinib mesylate, dasatinib and nilotinib are used to treat CML, however, cases of resistance have been linked to mutation in Bcr-Abl1, duplication of the cr Ph and overexpression of the bcr-abl1. The resistance or refractoriness of some patients to treatment with TK inhibitors drives the studies to better understand the CML physiopathology and description of new therapeutic targets. In this context, this study investigated the participation of microRNAs in modulating expression of the genes that regulate apoptosis. The aim of this study was to investigate the effect of Bcr-Abl1 and its kinase activity in the expression of miRNAs in cell lines and CML patients. The RNA from cell lines, patients and controls were obtained by extraction with Trizol® and cDNA was synthesized with the kit High Capacity cDNA reverse transcription. The expression of miRNAs and target genes was quantified by real time PCR using SYBR Green PCR Master Mix® kit and TaqMan Universal PCR Master Mix®. The Bcr-Abl1 inhibition in the cell line HL-60.Bcr-Abl1 treated with imatinib mesylate increased the expression of miR-let-7d, miR-15a, miR-130a and miR-145 and decreased miR-21 levels. Treatment with dasatinib increased the expression of miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-30e, miR-130a and miR-142-3p. Nilotinib increased the expression of miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-130a and miR-145 and, decreased miR-let-7d and miR-21 levels. The results of the analysis among patients with CML in different stages of disease showed high levels of miR-15a, miR-130b and miR-145 in chronic phase versus controls and low levels of miR-16, miR-26a and miR-146a. Patients in advanced phases versus controls showed low expression of miR-let-7d, miR-16, miR-142-3p, miR-145 and miR-146a. Low levels of miR-let-7d, miR-15a, miR-16, miR-29c, miR-142-3p, miR-145 and miR-146a were observed in CML advanced phases when compared with chronic phase. The antiapoptotic genes a1, bcl-2, c-flip, ciap-1 and ciap-2 were higher in chronic phase than in controls. The c-flip expression was decreased and a1, ciap-1 and mcl-1 expression was increased in advanced phases when compared to controls and chronic phase. CML patients resistant to imatinib mesylate presented low levels of miR-26a, miR-29c, miR-130b, miR-146a and ciap-1 and mcl-1 antiapoptotic genes. The data obtained suggest that Bcr-Abl1 TK modulates the miRNA expression which has target genes involved in the apoptosis' regulation.

Resumen: La leucemia mieloide crónica (LMC) es un trastorno mieloproliferativo que resulta de la expansión clonal de células precursoras hematopoyéticas. Su fisiopatología está ligada al cromosoma (cr) Filadelfia (Ph) originado de la t (9, 22) y del oncogén BCR-ABL, que codifica la proteína BCR-ABL1 con actividad constitutiva de tirosina cinasa (TC). La expresión de Bcr-Abl determina la leucemogénesis mediante la alteración en la adhesión de las células progenitoras leucémicas al estroma de la médula ósea y la resistencia a la apoptosis. Los inhibidores de TC, como el mesilato de imatinibe, dasatinibe y nilotinibe, se usan para tratar la LMC; sin embargo, los casos de resistencia se han relacionado con mutaciones en BCR-ABL1, la replicación del cr Ph y la superexpresión del gen BCR-ABL1. La resistencia o refractariedad de algunos pacientes al tratamiento con inhibidores de TC impulsa los estudios para comprender mejor la fisiopatología de la LMC y la descripción de nuevos blancos terapéuticos. En este contexto, este estudio investigó la participación de microARNs en la modulación de la expresión de los genes que regulan la apoptosis. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de BCR-ABL1 y la actividad de la tirosina cinasa Bcr-Abl en la expresión de estos microARNs en líneas celulares y en pacientes con LMC. El ARN de las líneas celulares, de los pacientes y de los controles se obtuvo por extracción con Trizol® y el cADN se sintetizó con el kit High Capacity cDNA reverse transcription. La expresión de los microARNs y los genes diana se cuantificó por PCR en tiempo real utilizando el kit SYBR Green PCR Master Mix® e TaqMan Universal PCR Master Mix®. La inhibición de la BCR-ABL1 en la línea HL-60.Bcr-Abl1 tratada con mesilato de imatinibe aumentó la expresión de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-130a e miR-145, y disminuyó los niveles de expresión de miR-let-7d y miR-21. El tratamiento con dasatinibe aumentó la expresión de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-21, miR-30e, miR-130a e miR-142-3p. El nilotinibe aumentó la expresión de miR-let-7e, miR-15a, miR-16, miR-130a e miR-145, y disminuyó los niveles de expresión de miR-let-7d y miR-21. Los resultados del análisis entre los pacientes con LMC en

diferentes etapas de la enfermedad mostraron expresión de altos niveles de miR-15a, miR-130b y miR-145 en la fase crónica en comparación con los controles, y bajos niveles de miR-16, miR-26a y miR-146a. Los pacientes en estadios avanzados, frente a los controles, mostraron una baja expresión de miR-let-7d, miR-16, miR-142-3p, miR-145 y miR-146a. Niveles bajos de miR-let-7d, miR-15a, miR-16, miR-29c, miR-142-3p, miR-145 y miR-146a fueron observados en las etapas avanzadas de la LMC en relación a la fase crónica. Los genes anti-apoptóticos a1, bcl-2, c-flip, ciap-1 y ciap-2 fueron encontrados más elevados en la fase crónica que en los controles. La expresión del gen c-flip fue encontrada reducida y la de los genes a1, ciap-1 e mcl-1 aumentada en estadios avanzados, en comparación con los controles y con la fase crónica. Los pacientes con LMC resistentes a IM tenían niveles más bajos de miR-26a, miR-29C, miR-130b, miR-146a y de los genes anti-apoptóticos ciap-1 e mcl-1. Los datos obtenidos sugieren que la TC Bcr-Abl modula la expresión de microARNs que tienen por blanco genes que regulan la apoptosis.

Comissão: Fabíola Attié de Castro
Katia Borgia Barbosa Pagnano
Andréia Machado Leopoldino
Ischia Teresinha Lopes Cendes
Eduardo Magalhães Rego

Aluno: Gabriela Braga Rodrigues

Orientador: Gilberto Ubida Leite Braga

Defesa: 12/12/2012

Título: Inativação fotodinâmica de espécies de *Candida* e *Trichophyton* e de *Cryptococcus neoformans* com fotossensibilizadores fenotiazínicos e com uma cloroalumínio ftalocianina em nanoemulsão

Title: Photodynamic inactivation of *Candida* and *Trichophyton* species and of *Cryptococcus neoformans* with phenothiazinium photosensitisers and with a chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion

Título: Inactivación fotodinámica de especies de *Candida* y *Trichophyton* y de *Cryptococcus neoformans* con fotossensibilizadores fenotiazina y con un cloroalumínio ftalocianina en nanoemulsión.

Resumo: Espécies de fungos dos gêneros *Candida* e *Trichophyton* e *Cryptococcus neoformans* são os mais importantes agentes causadores de micoses em humanos. A seleção de linhagens tolerantes aos fungicidas atualmente utilizados torna extremamente necessário o desenvolvimento de novas estratégias para o controle desses patógenos. A inativação fotodinâmica (IF) de fungos baseia-se na utilização de um fotossensibilizador (FS) que se acumula preferencialmente nas células-alvo e que pode ser ativado por exposições à luz visível. A ativação do FS induz a formação de espécies reativas de oxigênio que matam a célula fúngica. O uso de FS para o tratamento de micoses é uma aplicação recente e promissora da IF de fungos. No presente estudo, foram avaliados os efeitos dos tratamentos fotodinâmicos (TF) com os FS fenotiazínicos azul de metileno (MB), azul de toluidina (TBO), novo azul de metileno (NMBN), o derivado pentacíclico do azul de metileno S137 e com uma cloroalumínio ftalocianina em nanoemulsão (CIAIPc/NE) nas leveduras *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e nos microconídios dos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*. Os efeitos dos TF com os diferentes FS fenotiazínicos também foram avaliados na linhagem celular L929 de camundongo. Inicialmente, a eficácia dos TF foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada FS para cada dose de luz. Adicionalmente, nas condições otimizadas, também foram determinados os efeitos dos TF na sobrevivência das diferentes espécies de fungos. Os MICs variaram tanto entre FS como entre espécies e diminuíram com o aumento da dose de luz. Entre os FS fenotiazínicos, para a maioria dos tratamentos (espécies e doses de luz), o NMBN e o S137 apresentaram os menores MICs. Os MICs para o NMBN e para o S137 foram $\leq 2,5 \mu\text{M}$ para todas as espécies de *Candida*, para doses $\geq 20 \text{ J cm}^{-2}$. MICs para a CIAIPc/NE foram tão baixos quanto $0,01 \mu\text{M}$ para algumas das espécies de *Candida*. O TF com NMBN e S137 resultaram em redução de pelo menos 3 logs na sobrevivência de todas as espécies de *Candida* e de *Trichophyton*. O TF com CIAIPc/NE resultou em redução de até 4 logs na sobrevivência de *C. albicans* e *C. tropicalis* e de até 6 logs na sobrevivência de células melanizadas de *C. neoformans*. A internalização da CIAIPc foi confirmada por microscopia confocal de fluorescência e a quantidade incorporada pelas células foi dependente da concentração do FS. As toxicidades relativas entre os diferentes FS para as células de mamífero foram semelhantes às observadas em fungos, por exemplo maior toxicidade e fototoxicidade do NMBN e do S137 comparada às do MB e TBO

Summary: Fungal species of the genera *Candida* and *Trichophyton* and *Cryptococcus neoformans* are the main responsible for mycoses in humans. The selection of fungal strains resistant to currently used fungicides makes the development of alternative fungus-control techniques highly desirable. Fungal photodynamic inactivation (PI) is based on the use of a visible light-activate photosensitiser (PS) that preferentially accumulates in the cell of the target microorganism. The activation of the PS starts photochemical processes that produce a series of reactive oxygen species (ROS) that kill the fungal cell. The use of PS to treat mycoses is a novel and promising application of PI. In the present study, the effects of the photodynamic treatments (PDT) with the phenothiazinium PS methylene blue (MB), toluidine blue O (TBO), new methylene blue N (NMBN), the novel pentacyclic photosensitiser S137

and with a chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion (CIAIPc/NE) on the yeasts *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *Cryptococcus neoformans* and on microconidia of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* were evaluated. The effects of the PDT with the phenothiazinium PS were also evaluated on the mouse fibroblast cell line L929. The efficacies of the PDT were evaluated initially by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) of each PS for each light dose. Additionally, for the optimized conditions, the effects of the PDT on the survival of the different fungal species were also determined. MICs varied both among PS and species and decreased with light dose increase. Among the phenothiazinium PS, for most treatments (species and light doses), NMBN and S137 showed the lowest MICs. MICs for NMBN and S137 were $\leq 2.5 \mu\text{M}$ for all the *Candida* species to light doses $\geq 20 \text{ J cm}^{-2}$. MICs for CIAIPc/NE were as low as $0.01 \mu\text{M}$ for some of the *Candida* species. PDT with NMBN and S137 resulted in a reduction of at least 3 logs in the survival of all *Candida* and *Trichophyton* species. PDT with CIAIPc/NE resulted in reductions up to 4 logs in the survival of *C. albicans* and *C. tropicalis* and up to 6 logs in the survival of *C. neoformans* melanized cells. Internalization of CIAIPc by *C. neoformans* was confirmed by confocal fluorescence microscopy, and the degree of uptake was dependent on PS concentration. The relative toxicities among the different PS to mammalian cell were similar to the antifungal data, i.e. greater toxicity and phototoxicity with NMBN and S137 compared to MB and TBO.

Resumen: Especies de hongos del género *Candida* y *Trichophyton* y *Cryptococcus neoformans* son los agentes más importantes causantes de las infecciones fúngicas en los seres humanos. La selección de cepas resistentes a los fungicidas utilizados actualmente se hace extremadamente necesario el desarrollo de nuevas estrategias para el control de estos patógenos. La inactivación fotodinámica (IF) de los hongos se basa en el uso de una foto sensibilizadora (FS) que se acumula preferentemente en las células diana y puede ser activado por la exposición a la luz visible. La activación de FS induce la formación de especies reactivas de oxígeno que mata la célula fúngica. El uso de FS para el tratamiento de las micosis es una aplicación prometedora y reciente de IF de los hongos. Fueron evaluados los efectos de la terapia fotodinámica (TF) con FS fenotiazina azul de metileno (MB), azul de toluidina (TBO) y nuevo azul de metileno (NMBN), un derivado de azul de metileno, no comercial, denominado S137 y un cloroaluminio ftalocianina en nanoemulsión (CIAIPc/NE) en la levadura *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* y en los microconidios de los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*. Inicialmente, la eficacia de la TF se evaluó mediante la concentración mínima inhibitoria (CIM). Cuanto menor sea el CIM, fue considerado como más eficaz el TF. Este enfoque fue muy conveniente porque fue posible revisar un gran número de parámetros. Después de determinar los parámetros más adecuados para la IF de cada una de las especies, se realizaron experimentos en los que la eficacia de la TF fue evaluada por la fracción de supervivencia. La supervivencia inferior se consideró la TF más eficaz. En pequeñas dosis de luz (5 y 10 J cm^{-2}), la FS fueron el NMBN más eficaz y S137. El FS S137 era tóxico en la oscuridad para todas las especies. Cuando la supervivencia se evaluó por la fracción de supervivencia de la TF con la NMBN FS y S137 fueron capaces de reducir en al menos tres órdenes de magnitud, la supervivencia de todas las especies de *Candida* y *Trichophyton*. El TF con diferentes concentraciones de CIAIPc/NE fueron capaces de reducir, tanto como cuatro órdenes de magnitud de la supervivencia celular, de *C. albicans* y *C. tropicalis*. En las mismas condiciones, CIAIPc/NE fue capaz de reducir hasta seis órdenes de magnitud, la supervivencia celular melanizadas de *C. neoformans*. En el caso específico de IF *C. neoformans* con CIAIPc/NE, experimentos adicionales se realizaron, utilizando espectrofluorimetría y microscopía confocal para determinar la cantidad de FS incorporada por célula, y para determinar la ubicación de FS durante el TF. El CIAIPc/NE entrado en la célula fúngica y distribuido por su citoplasma. La toxicidad de la fenotiazina FS en la oscuridad, y los efectos de la TF también se evaluó en fibroblastos de ratón mediante el ensayo de MTT. El NMBN y TBO fueron tóxicos en la oscuridad a una concentración de 10 mM y la TF con NMBN y S137 fueron los que provocaron la mayor reducción en la viabilidad celular.

Comissão: Gilberto Ubida Leite Braga
Regina Celia Candido
Iouri Borissevitch
Marcia Regina von Zeska Kress
Ana Claudia Pavarina

Aluno: Lilian Cataldi Rodrigues

Orientador: Marcelo Dias Baruffi

Defesa: 12/09/2012

Título: Avaliação do impacto biológico da Galectina-1, endógena e exógena, sobre funções de neutrófilos

Title: Evaluation of the biological impact of Galectin-1, endogenous and exogenous, on neutrophil functions

Resumo: A galectina-1 (Gal-1) é uma lectina que reconhece β -galactosídeos e participa de vários processos biológicos, incluindo a modulação da resposta inflamatória. Dados da literatura mostram a participação desta lectina na indução da exposição de fosfatidilserina (FS - um marcador de apoptose), na geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) e na modulação quimiotática de neutrófilos. Entretanto, ainda são escassos os dados relacionados ao impacto biológico da Gal-1, exógena e endógena, sobre a biologia destas células. Neste trabalho foram avaliados, in vitro, alguns aspectos funcionais da interação Gal-1/neutrófilo. Determinou-se o nível de expressão da Gal-1 (Western Blotting) e de seu mRNA (PCR real time), em leucócitos humanos obtidos do sangue periférico de doadores saudáveis e em células da linhagem promielocítica humana (HL-60). Leucócitos do sangue periférico e células HL-60 não expressam níveis detectáveis da proteína e também do mRNA para Gal-1. Por meio de ensaios de quimiluminescência (QL) foi possível analisar a capacidade da Gal-1 recombinante humana de induzir e modular a produção de EROs em neutrófilos humanos não ativados e ativados com fMLP (n-Formil-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine). A Gal-1 induz a produção de EROs de modo dose-dependente em neutrófilos ativados com fMLP. Entretanto, em neutrófilos não ativados esta lectina não induz o metabolismo oxidativo e, além disso, é capaz de modular negativamente a produção de EROs em resposta ao fMLP. Tanto nas células não ativadas quanto ativadas com fMLP, os efeitos da Gal-1 na produção de EROs estão parcialmente associados a sua propriedade lectínica. Na literatura ainda não há relatos sobre a interferência da Gal-1 no metabolismo oxidativo em neutrófilos ativados com repetidas doses de fMLP. Sabe-se que o tratamento sucessivo com fMLP reduz os níveis de produção de EROs por neutrófilos, no entanto, a presença de Gal-1 não interferiu neste processo. Interessantemente, neutrófilos recuperados do peritônio de camundongos Gal-1^{-/-} liberam mais EROs em resposta ao fMLP e a Gal-1 exógena quando comparado aos neutrófilos de animais selvagens. Com base nos achados in vitro e sabendo que na sepse polimicrobiana o neutrófilo desempenha um papel importante, o próximo passo foi utilizar o modelo de M-CLP (sepse moderada) em camundongos destituídos (Gal-1^{-/-}) ou não (Gal-1^{+/+}) do gene da Gal-1. Animais Gal-1^{-/-}, apresentam menor taxa de sobrevivência. O influxo de neutrófilos e a carga bacteriana no peritônio são maiores nos animais Gal-1^{-/-} apesar da menor quantidade de bactérias detectadas no sangue, em relação aos animais selvagens. No pulmão, o influxo de neutrófilos é semelhante para ambos os grupos. No entanto, após a injeção intraperitoneal de 10⁷ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias, camundongos Gal-1^{-/-} apresentam maior atividade bactericida no lavado peritoneal e sangue, em relação aos selvagens. A participação da Gal-1 na homeostase de neutrófilos foi demonstrada in vitro, por citometria de fluxo (anexina-V-FITC), onde a indução de FS nos neutrófilos tratados com Gal-1 favoreceu a fagocitose destas células por macrófagos. Portanto, este conjunto de resultados sugere que a Gal-1, exógena ou endógena, pode modular funções imunológicas de neutrófilos e participar da regulação do processo inflamatório/infeccioso sistêmico.

Summary: Galectin-1 (Gal-1) is a lectin that recognizes β -galactosides and participates in biological processes, including modulation of the inflammatory response. Literature data show the involvement of this lectin to induce exposure of phosphatidylserine (PS - a marker of apoptosis), in the generation of reactive oxygen species (ROS) and in modulation of neutrophil chemotaxis. However, there are few data related to the biological impact of exogenous and endogenous Gal-1 on the biology of these cells. This study evaluated, in vitro, some functional aspects of the interaction of Gal-1 and neutrophil. It was determined the expression level of Gal-1 (Western blotting) and its mRNA (real time PCR) on human leukocytes obtained from peripheral blood of healthy donors and human promyelocytic cell

line (HL-60). Peripheral blood leukocytes and HL-60 cells do not express detectable levels of this protein as well as the Gal-1 mRNA. Through chemiluminescence testing (CL) it was possible to analyze the ability of recombinant human Gal-1 to induce and modulate the production of ROS in naïve and activated (n-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine-fMLP) human neutrophils. Gal-1 induces ROS production in a dose-dependent way in fMLP activated neutrophils. However, in naive neutrophils this lectin does not induce oxidative stress and can negatively modulate ROS production in response to fMLP. The effects of Gal-1 on ROS production in both non-activated cells and activated cells are partially associated with their lectin property. In the literature there are no data about the interference of Gal-1 on ROS production in activated neutrophils with repeated doses of fMLP. It is known that the subsequent treatment with fMLP reduced levels of ROS production by neutrophils; however, the presence of Gal-1 did not affect this process. Interestingly, peritoneum neutrophils from Gal-1^{-/-} mice release more ROS in response to fMLP and exogenous Gal-1 when compared to neutrophils from wild type animals. Based on the in vitro findings and considering that in polymicrobial sepsis, neutrophils play an important role, the next step was to use the M-CLP model (moderate sepsis) in mice lacking (Gal-1^{-/-}) or not (Gal-1^{+/+}) Gal-1 gene. Gal-1^{-/-} animals present lower survival rate and fewer bacteria in the blood despite having higher bacterial load in infectious focus in relation to wild type mice. The rates of neutrophils influx into the peritoneum and lungs are similar for both groups. The participation of Gal-1 in the homeostasis of neutrophils was demonstrated in vitro by flow cytometry (annexin V-FITC), where induced PS by Gal-1 in the neutrophils enhanced the phagocytosis of these cells by macrophages. Therefore, this set of results suggests that Gal-1, exogenous or endogenous, can modulate immune functions of neutrophils and participate in the regulation of inflammatory/infectious disorders.

Comissão: Marcelo Dias Baruffi
Kamilla Swiech Antonietto
José Carlos Farias Alves Filho
Thiago Mattar Cunha
Lucia Helena Faccioli

Aluno: Lizziane Kretli Winkelstroter

Orientador: Elaine Cristina Pereira de Martinis

Defesa: 10/12/2012

Título: Análise da expressão gênica, formação de biofilmes e adesão/invasão a célula Caco-2 por *Listeria monocytogenes* em diferentes condições encontradas no trato gastrointestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas

Title: Analysis of gene expression, biofilm formation and adhesion/invasion to Caco-2 cell by *Listeria monocytogenes* in different conditions found in the gastrointestinal tract, in food and in the presence of bacteriocins

Resumo: *Listeria monocytogenes* é uma bactéria transmitida principalmente via alimentos, podendo causar infecções graves em pessoas imunodeprimidas e durante a gestação, devido à sua capacidade de sobreviver intracelularmente. A formação de biofilmes por *L. monocytogenes* é um fator preocupante para as indústrias de alimentos, pois biofilmes comprometem a sanitização de superfícies, aumentando os riscos de contaminação. Além disso, alguns estudos indicam que a capacidade de formação de biofilme pode estar correlacionada com a capacidade de algumas bactérias causarem doença. O controle de *L. monocytogenes* representa um desafio, especialmente em alimentos refrigerados e prontos para o consumo, pois esta bactéria é de natureza psicrotrófica, ubíqua e adapta-se rapidamente a diferentes condições ambientais, por meio da modulação da expressão de seus genes. O efeito das condições ambientais na expressão de genes de virulência de *L. monocytogenes* não é totalmente compreendido. Neste trabalho, isolados de *L. monocytogenes* de diversas origens foram avaliados quanto à sua capacidade de formar biofilmes, de aderir/invadir em células eucarióticas e também de expressar o gene internalina (int A), que está relacionado com o potencial de virulência. A presença de bacteriocinas de bactérias lácticas (BAL) e incubação a 5°C foram os principais fatores que influenciaram a formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, em comparação com caldo BHI (controle). Em geral, a adesão/invasão de células Caco-2 foram significativamente menores em pH baixo (4,5), incubação a 5°C e na presença de 0,3% Oxgall (sais biliares). Entretanto, dois isolados de *L. monocytogenes* (INCQS 353 e Reg 26c) apresentaram aumento nas taxas de invasão quando cultivados na presença de NaCl a 5% ($P < 0,05$). Um isolado de *L. monocytogenes* (H-2) obtido de hortaliças apresentou a maior capacidade de formação de biofilme e de invadir células Caco-2, sugerindo que há uma possível relação entre a formação de biofilme e de potencial de virulência. No ensaio para avaliação da expressão do gene intA, todos os isolados foram regulados negativamente pela presença de bacteriocinas, Oxgall 0,3%, pH 4,5 e incubação a 5°C. No entanto, para um isolado de *L. monocytogenes* (HU 471), a expressão do gene int A foi oito vezes maior na presença de sacarose, indicando que os componentes de alimentos podem aumentar a virulência e o potencial de infecção de *L. monocytogenes*.

Summary: *Listeria monocytogenes* is a bacterium transmitted mainly by foods and can cause serious infections in immunocompromised individuals and in pregnant woman due to their ability to survive intracellularly. The biofilm formation by *L. monocytogenes* is a concern for the food industry because microorganism in biofilms may survive after treatment with sanitizers and increases the risk of food contamination. In addition, some studies indicate that the ability of biofilm formation can be correlated with virulence potential. The control of *L. monocytogenes* is a challenge, especially in chilled and ready to eat foods since it has psychrotrophic nature, it is ubiquitous and can adapt quickly to different environmental conditions by modulating the expression of its genes. The effect of environmental conditions on gene expression and virulence of *Listeria monocytogenes* is not fully understood. In this report, *L. monocytogenes* isolates from diverse sources were evaluated for their ability to form biofilms, for adhesion/invasion of eukaryotic cells and also for differential expression of internalin A gene (int A), which is related to virulence potential. The presence of bacteriocins of lactic acid bacteria (BAL) and incubation at 5°C were the main factors that influenced biofilm formation by *L. monocytogenes*, in comparison with BHI broth (control). In general, adhesion and invasion of Caco-2 cells were significantly lower in low pH (4.5), incubation at 5°C and in presence of Oxgall 0.3% (bile salts). On the other hand, two *L. monocytogenes* isolates

(INCQS 353 and Reg 26c) showed higher invasion rates when cultivated in the presence of NaCl 5% ($P < 0.05$). One *L. monocytogenes* (H-2) isolated from minimally processed leafy vegetables showed the strongest ability to form biofilm and to invade Caco-2 cells, under selected conditions, suggesting there may be a relationship between biofilm formation and virulence potential. For the vast majority of isolates, expression of int A gene were down regulated by the presence of bacteriocins, OXgall 0.3%, pH4.5 and incubation at 5°C. Nonetheless, for one *L. monocytogenes* isolate (HU 471) expression of int A gene was eight times higher in presence of sucrose, indicating that food components can increase the infectiveness of *L. monocytogenes*.

Comissão: Elaine Cristina Pereira De Martinis
Luciana Maria Ramires Esper
Mariza Landgraf
Marcia Nitschke
Evandro Watanabe

Aluno: Vânia Brazão

Orientador: Jose Clovis do Prado Junior

Defesa: 09/11/2012

Título: Avaliação da suplementação de zinco e melatonina durante a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*

Title: Evaluation of zinc and melatonin supplementation during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*

Resumo: A identificação de moléculas com potenciais ações terapêuticas e a compreensão dos mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune frente à administração de substâncias farmacologicamente ativas em modelos experimentais infectados por *Trypanosoma cruzi* tem contribuído de maneira importante nas investigações de novas terapias para a doença de Chagas. Estudos prévios demonstraram as ações do zinco e da melatonina sobre a imunidade do hospedeiro, durante a fase aguda da infecção chagásica experimental, potencializando a resposta imune gerada contra o parasita. O presente estudo teve como objetivo avaliar o possível efeito imunomodulador da administração de zinco e melatonina em ratos Wistar machos durante a fase crônica da infecção por *T. cruzi*, utilizando os seguintes parâmetros: dosagens de citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IFN-, e TNF-, produção de óxido nítrico, proliferação de esplenócitos, citometria de fluxo para análise fenotípica das subpopulações de células T CD3+CD4+ e CD3+CD8+, células dendríticas, células NK (CD161+) e NKT (CD3+CD161+), macrófagos, moléculas co-estimuladoras CD28, CD80 e CD86, RT1B, análise dos marcadores CD11a e CD25 e detecção do processo de apoptose celular. O efeito imuno-modulador do zinco e da melatonina durante a fase crônica da infecção chagásica pode ser comprovado através redução no percentual de macrófagos, células dendríticas, linfócitos TCD4+ e TCD8+, apoptose celular, das concentrações de óxido nítrico, IFN- e MCP-1. Adicionalmente, a terapia com zinco e melatonina durante a infecção experimental resultou em modificações importantes na resposta imunológica, como evidenciado pelo aumento no percentual de células T reguladoras, da proliferação celular e dos níveis das citocinas IL-2, IL-4 e IL-10. O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que possam modular a resposta inflamatória, contribuindo para prevenção dos danos teciduais observados na fase crônica da doença, são alvos importantes no tratamento da doença de Chagas.

Summary: The identification of molecules with potential therapeutic actions and the comprehension of the mechanisms involved in modulating the immune response by the administration of pharmacologically active substances in experimental models infected with *Trypanosoma cruzi* have contributed significantly in the investigation of new therapies for Chagas' disease. Previous studies have demonstrated the actions of zinc and melatonin on host's immunity during the acute phase of experimental Chagas' disease, enhancing the immune response generated against the parasite. The present study aimed to evaluate the possible immunomodulatory effect of zinc and melatonin administration in male Wistar rats during the chronic phase of *T. cruzi* infection, using the following parameters: measurement of IL-2, IL-4, IL-10, IFN- and TNF-, nitric oxide, proliferation of splenocytes, flow cytometry for phenotypic analysis of CD3+CD4+ and CD3+CD8+ T cells subpopulations, dendritic cells, NK cells (CD161+) and NK T (CD3+CD161+), macrophages, co-stimulatory molecules CD28, CD80 and CD86, RT1B, analysis of markers CD11a and CD25 and detection of the apoptosis process. The immunomodulator effect of zinc and melatonin during the chronic phase of Chagas' disease was evaluated by a reduction of the percentage of macrophages, dendritic cells, CD4+ and CD8+ lymphocytes, cellular apoptosis, the concentrations of nitric oxide, IFN- and MCP-1. In addition, the treatment with zinc and melatonin during the experimental infection resulted in significant changes in the immune response, as evidenced by the increased percentage of regulatory T cells, cell proliferation and cytokine levels of IL- 2, IL-4 and IL-10. The development of new therapeutic strategies that can modulate the inflammatory response, contributing to prevention of tissue damage observed in the chronic phase, are important targets in the treatment of Chagas disease.

Comissão: Jose Clovis do Prado Junior
Gabriela Silva Bisson
Lucia Helena Faccioli
Ana Patricia Yatsuda Natsui
Luiz Ricardo Orsini Tosi