



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA

cafs

MESTRADO - 2005

Aluno: Érika Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Título: Isolamento e caracterização de microssatélites no fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis*

Title: Isoaltion and characterization of microsatellites from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*

Resumo: O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo termo-dimórfico, ou seja, possui a capacidade de crescer em duas formas morfológicas diferentes: a leveduriforme e a filamentosa. O *P. brasiliensis* é o agente causador da micose sistêmica Paracoccidioidomicose (PCM) que apresenta duas formas clínicas, a infecção local chamada de forma crônica e a infecção disseminada chamada de aguda. A maior parte dos casos relatados de PCM ocorre no Brasil, Venezuela e Colômbia. Para a caracterização genética das diferentes formas clínicas da PCM foram utilizados isolados clínicos e ambientais e identificados marcadores moleculares, por meio de uma coleção de "Random Sequence Tags" (RST) de *P. brasiliensis* (<http://goldman.fcfrp.usp.br>) que totaliza 3,8 Mb de seqüências únicas. Foram identificados 1.117 padrões de microssatélites e a maioria destes são encontrados em seqüências não-codificadoras. Como marcadores moleculares foram utilizados microssatélites polimórficos em regiões não - codificadoras, codificadoras e intrônicas para analisar o "background" genético em isolados de *P. brasiliensis* de diferentes formas clínicas e ambientais. Neste estudo a correlação não foi observada, mas esses marcadores moleculares de *P. brasiliensis* avaliados neste trabalho irão contribuir para futuros estudos epidemiológicos e patogênicos deste organismo.

Summary: *Paracoccidioides brasiliensis* is a thermodimorphic fungus which has the growing capacity in two different morphological forms: leveduriform and filamentous. *Paracoccidioides brasiliensis* is the causative agent of the systemic mycosis Paracoccidioidomycosis (PCM) which presents two clinical forms: the local infection called chronic form and the disseminated called acute form. The most part of PCM reported cases takes place in Brazil, Venezuela and Colombia. For PCM different clinical forms genetic characterization isolate clinical and environmental cases were used and molecular markers were identified through "Random Sequence Tags" (RST) collection of *P. brasiliensis* (<http://goldman.fcfrp.usp.br>) which totalize 3,8 Mb unique sequences. The 1.117 microsatellites patterns were identified and most of them are found in noncoding sequences. As molecular markers were used polymorphic microsatellites in noncoding regions, coding and intronic to analyze genetic background in isolated *P. brasiliensis* in different clinical and environmental ways. A correlation wasn't observed on this study, but these molecular markers evaluated on this work will contribute on epidemiological and pathogenic studies on this organism.

Defesa: 18/11/2005

Comissão: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman - FCFRP-USP
Prof. Dr. Paulo Sergio Rodrigues Coelho - FMRP-USP
Profa. Dra. Nadia Monesi - FCFRP-USP

Aluno: **Gabriela Ravanelli de Oliveira**

Orientador: Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha

Título: Estudo temporal da secreção de vasopressina e ocitocina durante choque séptico experimental induzido por ligadura e perfuração cecal

Title: Study time of the secretion of vasopressin and oxytocin during experimental septic shock induced by cecal ligation and perforation

Resumo: Sepsis é uma resposta sistêmica à infecção grave que apresenta várias alterações fisiológicas. Na fase tardia da sepsis, estudos clínicos relatam baixa concentração plasmática de arginina-vasopressina (AVP) apesar do agravamento da hipotensão. Nosso objetivo foi avaliar as alterações temporais na neurosecreção de AVP e ocitocina (OT) após ligadura e perfuração cecal (CLP), o modelo animal de sepsis experimental que mais adequadamente se assemelha a sepsis em humanos. Ratos Wistar (200-250g) foram submetidos ao estímulo séptico por CLP (20 perfurações com agulha 16G) ou à operação fictícia (OF). Os animais foram decapitados em 0, 0,5, 2, 4, 6 ou 24h após a cirurgia. O sangue foi coletado para a determinação do hematócrito, osmolalidade (pOsm), proteína, NO, AVP e OT plasmáticos. O conteúdo hormonal também foi determinado na neuro-hipófise, núcleos paraventriculares (PVN) e supraópticos (SON) do hipotálamo. O hematócrito foi maior no grupo CLP entre 0,5h e 6h. A pOsm diminuiu apenas em 24h após CLP ($268,1 \pm 2,0$ mOsm/Kg, $P < 0,001$). A concentração de proteínas plasmáticas diminuiu 4h após CLP ($3,1 \pm 0,6$ μ M; $P < 0,05$), enquanto o NO plasmático iniciou um aumento progressivo ($13,6 \pm 1,6$ μ M; $P < 0,05$) nesse período. A AVP plasmática no grupo CLP alcançou altas concentrações e mostrou dois picos, um maior imediatamente após a cirurgia (0min, $107,6 \pm 18,0$ pg/mL, $P < 0,05$) e outro menor após 6h ($10,9 \pm 2,2$ pg/mL, $P < 0,05$). A concentração de OT plasmática também foi maior, mas seu perfil temporal difere da AVP. Quanto ao conteúdo hipotalâmico e neuro-hipofisário, os dois grupos (OF e CLP) apresentaram padrões completamente diferentes. No grupo CLP o aumento no conteúdo hipotalâmico de AVP ocorreu somente após o segundo pico plasmático desse hormônio (6h após CLP) e não foi suficiente para repor os estoques neuro-hipofisários. Quanto a OT o aumento no conteúdo hipotalâmico e neuro-hipofisário foi evidente somente 24h após o estímulo, quando a secreção desse hormônio está basal. Os resultados sugerem que o sistema neurosecretório hipotalâmico na fase tardia da sepsis induzida por CLP está bastante comprometido, não sendo capaz de responder com o aumento da secreção hormonal aos estímulos fisiológicos, como hipotensão, apesar do aumentado conteúdo hipotalâmico.

Summary: Sepsis is the systemic response to severe infection showing several physiological alterations. In the later phase of sepsis, clinical studies report an inappropriate low level of plasma vasopressin (AVP), despite severe hypotension. Our aim was to study the time course of AVP and oxytocin (OT) neurosecretion following cecal ligation and puncture (CLP), an experimental animal model that most adequately resembles human sepsis. Male Wistar rats (200-250g) were submitted to lethal septic stimulus by CLP (20 punctures with 16G needle) or to sham operation. The animals were decapitated at 0, 0.5, 2, 4, 6 or 24h after surgery. Blood samples were collected for measurement of hematocrit, osmolality, plasma protein, NO, AVP and OT levels. The hormone contents were also determined in the neurohypophysis, paraventricular and supraoptic nuclei. Hematocrit was higher in CLP group between 0.5 and 6h ($P < 0,05$). Plasma osmolality decreased only at 24h ($268,1 \pm 2,0$ mOsm/Kg; $P < 0,001$). Plasma protein decreased 4h after CLP ($3,1 \pm 0,6$ g/dL; $P < 0,05$), while plasma NO showed a progressive increase ($13,6 \pm 1,6$ μ M; $P < 0,05$) at this period. Plasma AVP levels in the CLP group reached high levels and showed two peaks, a larger one immediately after the surgery (0min, $107,6 \pm 18,0$ pg/mL, $P < 0,05$) and another smaller one 6h later ($10,9 \pm 2,2$ pg/mL, $P < 0,05$). Plasma OT levels were also high but their temporal profile differed from that of AVP. In terms of hypothalamic and neurohypophysis hormone content, the two groups (sham and CLP) exhibited a completely different pattern. In CLP group the increase in the hypothalamic content of AVP occurred only after the second plasma peak (6h

after CLP) and was not enough to restore the neurohypophyseal stores. The increase in the hypothalamic and neurohypophyseal content of OT was evident only 24h after the stimulus, when the secretion was basal. The results suggest that the hypothalamic neurosecretory system in the late phase of sepsis induced by CLP is altered. The animals do not seem to be able to respond with increase in the hormonal secretion to the physiological stimulus, such hypotension, despite the increased hypothalamic content.

Defesa: 13/06/2005

Comissão: Profa. Dra. Maria Jose Alves da Rocha – FCFRP-USP
Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci - FMRP-USP
Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias – FMRP-USP

Aluno: Jilmara Baptista de Oliveira Codarin

Orientador: Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott

Título: Avaliação de parâmetros imunológicos em adolescentes com diferentes graus de deficiência de ferro

Title: Evaluation of immunological parameters in adolescents with different degrees of iron deficiency

Resumo: O ferro é necessário para manter a estrutura e função das células, estando envolvido em vários aspectos da defesa do organismo. A deficiência deste micronutriente é das doenças mais comumente encontradas em populações humanas, variando da depleção de estoques de ferro (grau I) até a anemia por deficiência de ferro (grau III). Entre os grupos de maiores riscos de anemia por deficiência de ferro encontram-se os adolescentes, nos quais a deficiência é causa freqüente de indisposição, cansaço, desatenção e incapacitação para o trabalho. Tendo em vista a necessidade de melhor compreensão das possíveis alterações imunológicas envolvidas na deficiência de ferro, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros da resposta imune humoral em adolescentes, portadores de diferentes níveis de deficiência de ferro através da quantificação de componentes do sistema complemento (C3 e C4), medida da atividade hemolítica da via clássica, classes (IgG, IgM, IgA) e subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) de imunoglobulinas. Em 80 adolescentes (14-18 anos), 53 do sexo feminino e 27 do sexo masculino, a determinação dos diferentes níveis de deficiência de ferro foi realizada através do eritograma, ferro e ferritina sérica e sTfR. Dos 80 pacientes em estudo, 12,5% (n=10) apresentaram-se com depleção de ferro e 13,75% (n=11) com deficiência de ferro, sendo que 03 adolescentes com deficiência de ferro apresentaram hemoglobina baixa. Dessa forma os adolescentes foram classificados em 3 grupos: adolescentes controle (N), depletados de ferro (DEP) e deficientes de ferro (DEF). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de IgG, IgA e IgM, nas subclasses de IgG e nas concentrações de C3 e C4 entre os diferentes grupos estudados. Entretanto, quando analisamos as subclasses de IgG em dois grupos constituídos apenas por adolescentes do sexo feminino, o grupo controle (N) e o grupo de adolescentes depletadas de ferro ou deficientes de ferro (DEP+DEF), observamos que as proporções entre as diferentes subclasses foram alteradas. Houve tendência de aumento dos níveis de IgG2 e IgG4 e diminuição dos níveis de IgG1 no grupo DEP+DEF, em relação ao grupo controle. Os estudos relacionando níveis de C3 e C4 e/ou atividade do sistema complemento são ainda mais escassos e controversos nesta faixa etária. Quando o parâmetro sTfR foi correlacionado isoladamente com a atividade hemolítica, considerando os grupos do sexo feminino, encontrou-se correlação significativa ($p=0,0227$), ou seja, adolescentes com maiores níveis séricos do sTfR apresentavam menor atividade hemolítica da via clássica. A análise destes últimos resultados, pode sugerir que a deficiência de ferro levaria a alterações em parâmetros relevantes da imunidade humoral, como subclasses de IgG e atividade do sistema complemento, o que explicaria, pelo menos em parte, a maior suscetibilidade desses indivíduos a infecções. Entretanto, como essas alterações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na amostragem utilizada neste trabalho, investigações adicionais poderão elucidar a relação dos diferentes graus de deficiência de ferro com a resposta imune humoral.

Summary: Iron is necessary for the maintenance of cell structure and function, being involved in several aspects of immune and non-immune host defense. Deficiency of this micronutrient is a common disease in humans, ranging from depleted stocks of iron (level I) to anemia (level III). Adolescents are considered a major risk group for iron deficiency anemia which is caused by on socio-economic characteristics, lifestyles, iron status, and dietary intake. In order to better understand the immunologic alterations involved in iron deficiency, the objective of this work was to evaluate the humoral immune response in adolescents with different iron deficiency degrees, through the quantification of complement system components (C3 and C4), measurement of the hemolytic activity of classical pathway and immunoglobulin classes (IgG, IgM and IgA) and subclasses (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). In this

study, we evaluated 80 adolescents (age ranged from 14 to 18 years), 53 of them were female and 27 were male. The quantification of iron deficiency was analyzed by erythrogram, iron, serum ferritin and sTfR. The results showed that 12.5% of the adolescents were iron depleted (level I) and 13.75% had iron deficiency (level II), being three of them with low levels of hemoglobin (level III). So we divided the studied population in three groups named: normal adolescents (N), iron depleted (DEP) and iron deficient (DEF). It was not observed significant statistical difference in the IgG, IgA, IgM, IgG subclasses, C3 and C4 levels among those groups. However, when we analyzed only female adolescents, comparing normal (N) to depleted plus deficient (DEP+DEF) groups, we observed modulation of IgG isotypes in despite of total IgG levels being normal. Group DEP+DEF demonstrated elevated levels of IgG2 and IgG4 and lower levels of IgG1 compared to the control group (N). Additionally, the correlation of sTfR and hemolytic activity were statistically significant ($p=0.0227$), concluding that high serum levels of sTfR presented low hemolytic activity of the classical pathway. Taking those results together, we can speculate that iron deficiency could conduct to alterations in important parameters of humoral response, like IgG subclasses and complement system activity, that could explain at least in part the susceptibility to infections of these individuals. Nevertheless, as this alterations did not show a significant statistical support in the sampling of this work, complementary investigations will be necessary to clarify the different levels of iron deficiency and humoral immune response.

Defesa: 01/07/2005

Comissão: Profa. Dra. Luciana Simon Pereira Crott – FCFRP-USP
Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado - UNIARA
Profa. Dra. Ana Maria de Souza – FCFRP-USP

Aluno: **Leony Cristina Caetano**

Orientador: Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

Título: *Calomys callosus* x *Trypanosoma cruzi*: seria a relação parasita-hospedeiro bem sucedida no envelhecimento?

Title: *Calomys callosus* x *Trypanosoma cruzi*: seria a relação parasitahospedeiro bem sucedida no envelhecimento?

Resumo: O envelhecimento afeta todas as espécies, evidenciando-se em diferentes idades, órgãos e sistemas dependendo de uma cascata de múltiplos acontecimentos. Neste trabalho estudamos a relação de alguns aspectos da patogenia da doença de Chagas crônica experimental com processo de senilidade em *Calomys callosus* infectados com a cepa MORC-1 de *Trypanosoma cruzi*. *Calomys callosus* alberga está parasitose por toda vida, sem apresentar sintomatologias clínicas que o levem a morte. A cepa MORC-1 mostra-se altamente virulenta para camundongos, ocasionando tropismo preferencial para fibras cardíacas e hepatócitos, com pico parasitêmico ao redor de 10 dias após o inoculo. A parasitemia foi negativa para todos os grupos estudados embora a cultura de células apresentou positividade para os grupos fêmeas imunossuprimidas com ciclofosfamida. A contagem de macrófagos foi reduzida e a contagem específica apresentou perfil linfocitário. Ocorreu diminuição no número de neurônios do plexo mientérico do esôfago e cólon dos grupos estudados. A morfometria do corpo neuronal do esôfago e cólon de fêmeas e machos apresentou uma ação protetora da ciclofosfamida em relação aos outros grupos. Através da obtenção destes dados, comparamos a severidade ou não da patogenia no decorrer da infecção em animais submetidos ao envelhecimento e a ação da ciclofosfamida.

Summary: Age process affects all species, showing itself in different ages, organs and systems on the dependence of multiple factors. In this work it was studied some aspects of the pathogeny of Chagas disease concerning to the age process in *Calomys callosus* infected with the MORC-1 strain of *Trypanosoma cruzi*. *Calomys callosus* can bear this parasite through all life long, without any clinical signs of illness. MORC-1 strain is highly virulent for mice, reaching its parasitemia peak around 10 days after infection, leading animals all to death. It displays a preferential tropism for cardiac fibers and hepatocytes. For all animals, parasitemia was negative, although cell culture displayed positive results for infected and cyclophosphamide immunosuppressed females. Reduced macrophage count was observed and specific cell counts showed a lymphomonocitary prolife. A reduction of neurons of the mienteric plexus and colon was also present. Cyclophosphamide conferred a protection that was observed through neuronal body morphometry of esophagus and colon from infected male and female animals when compared to other groups. Through these data we can compare the severity of neuronal destruction and may be a protection of cyclophosphamide reposition in aged animals.

Defesa: 25/04/2005

Comissão: Prof. Dr. Jose Clovis do Prado Junior – FCFRP-USP
Prof. Dr. Sérgio Zucoloto - FMRP-USP
Profa. Dra. Ana Amelia Carraro Abrahão – FCFRP-USP

Aluno: Luciano Angelo de Souza Bernardes

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman

Título: Análise *in silico* de "Random Sequence Tags" (RSTs) do fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis*

Title: In silico analysis of random sequence tags from the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*

Resumo: O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) apresenta duas formas morfológicamente distintas, micélio (saprófita) e levedura (patogênica). Supõe-se que ele se desenvolva no solo e/ou plantas e, apesar de ainda não existir um estudo conclusivo, acredita-se que animais participem de seu ciclo de desenvolvimento. Sendo o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), endemia do Brasil e áreas adjacentes, causa uma doença que se manifesta sob duas formas: (i) juvenil: aguda e acomete crianças de ambos os sexos e adultos com menos de 30 anos (3 a 4% dos casos) e (ii) adulta: crônica e representa a maioria dos casos, atacando preferencialmente homens (80% dos casos) da zona rural, na sua fase mais produtiva (30 a 50 anos). Devido à relativa falta de ferramentas moleculares para a manipulação genética deste fungo, foram concentrados esforços em análises genômicas, para complementar os estudos e auxiliar a compreensão molecular da patobiologia deste organismo. Este trabalho teve como objetivo a análise computacional de Random Sequence Tags (RSTs) através do desenvolvimento de um sistema informatizado automático de recebimento via rede mundial de computadores, processamento (Phred e Cross_match) e disponibilização para visualização e análises dos dados ("pipeline"). Depois de todos os dados recebidos, estes foram agrupados em conjuntos para: (i) execução de comparações diversas com dados próprios (ESTs) e externos (NCBI), que permitiram classificá-los segundo sua função biológica (sistema de anotação desenvolvido localmente); (ii) determinação de microssatélites; (iii) análise da estrutura "intrônica"; e (iv) polimorfismos de DNA.

Summary: *Paracoccidioides brasiliensis* is a thermomorphous fungus that presents two distinct morphological forms: mycelial (saprophytic) and yeast (pathogenic) as a result of temperature switch. Despite the inexistence of conclusive studies, it is believed that some animals take part in the pathogen's life cycle in the soil and/or plants. *P. brasiliensis* is the causative agent of paracoccidioidomycosis (PCM) which is endemic and prevalent in Brazil and surrounding areas. PCM displays two distinct forms: (i) juvenile: acute, more frequently observed in children of both genders and adults under 30 years old (3 to 4% of the cases); (ii) adult: chronic, which represents the majority of the cases, mainly observed in males (80% of the cases) living in rural areas and compromising their labor force between the ages of 30 and 50 years old. Due to the relative lack of molecular tools to allow genetic manipulation of this fungus, steps have been taken to focus on genomic analysis of this pathogen in order to complement other studies and support the molecular understanding of the organism regarding its pathological process. This work aimed to perform a computational analysis of Random Sequence Tags (RSTs) from *P. brasiliensis* using an automatic computerized system developed for the reception (via internet) and processing (Phred and Cross_match) of the data as well as the visualization and final data analysis (pipeline). Once all data were received, they were grouped in clusters. The completion of this first step permitted the further analyses that included: (i) running different analyses for matching sequences through our own ESTs bank and the NCBI bank, allowing the sequences categorization according to biological function by means of an annotation system locally developed; (ii) microsatellites characterization; (iii) intronic structures analysis and (iv) DNA polymorphisms identification.

Defesa: 28/04/2005

Comissão: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goldman – FCFRP-USP
Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga – FCFRP-USP

Profa. Dra. Silvana Giuliatti – FMRP-USP

Aluno: Rodrigo Haddad

Orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Título: Caracterização Molecular do vírus da Hepatite B (HBV) em pacientes tratados com lamivudina

Title: Molecular characterization of Hepatitis B virus (HBV) in patients treated with lamivudine

Resumo: Hepatite B é um grande problema de saúde pública em todo o mundo: mais de um terço da população mundial já foi infectada pelo vírus da hepatite B (HBV) e cerca de 350 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas com o vírus. O HBV pertence à família *Hepadnaviridae* e seu genoma é constituído por um DNA circular, parcialmente dupla fita e de aproximadamente 3200 pares de base. Até o momento sete genótipos do HBV são conhecidos (A - G) e eles estão distribuídos por todo o mundo. Pessoas com a infecção crônica do HBV têm o risco aumentado de desenvolver doenças hepáticas, como cirrose e carcinoma hepatocelular. Assim, a maior arma no tratamento de infecção crônica do HBV é suprimir a replicação do vírus antes que ele cause danos irreversíveis ao fígado. Alguns antivirais têm sido usados com segurança e eficácia no intuito de evitar a replicação viral, entre eles a Lamivudina, um inibidor da polimerase viral. Entretanto, tem sido observado que vírus com mutações específicas no *motif* YMDD da polimerase viral são resistentes ao tratamento com esta droga. A mutação mais comum é a M204V, formando a seqüência YVDD, seguida pela mutação M204I (YIDD). A primeira freqüentemente é acompanhada pela mutação L180M. Recentemente foi observada a mutação M204S. O objetivo principal deste trabalho foi determinar a possível dependência do HBV no desenvolvimento da resistência à lamivudina. Para determinação da incidência dos genótipos do HBV em pacientes crônicos na região, parte do gene da polimerase viral de amostras de 38 pacientes que responderam ao tratamento com lamivudina foi amplificado e seqüenciado. Dezesesseis amostras (42,1%) possuíam vírus de genótipo A, 21 (55,3%) de genótipo D e uma (2,6%) de genótipo F. Esse resultado indicou que a incidência de amostras com genótipo D foi de 1,3X maior que das amostras com genótipo A. Por outro lado, a incidência dos genótipos em amostras de 12 pacientes que apresentaram mutações que conferem resistência ao tratamento foi de 33,3% (4/12) para o genótipo A e 66,7% (8/12) para o genótipo D. Neste caso, a incidência de amostras com genótipo D foi 2X maior que a de amostras com genótipo A. Esses resultados indicam que a incidência da resistência ao tratamento foi 1,5X (2/1,3) maior em pacientes infectados com o HBV de genótipo D. Ou seja, pacientes infectados com o vírus do genótipo D parecem ter 1,5X mais probabilidade de desenvolver mutação que confere resistência do que aqueles infectados com o genótipo A. Além disso, como visto em outros trabalhos, notou-se também que quanto maior o tempo de tratamento maior a probabilidade do surgimento de mutações que conferem resistência, e que a irregularidade no tratamento pode resultar na não resposta a terapia.

Summary: Hepatitis B virus (HBV) is a major public health problem worldwide: more than a third of the world's population has been infected with HBV and about 350 million persons are chronically infected with the virus. HBV is classified in the family *Hepadnaviridae* and contains a partially double-stranded DNA genome of approximately 3,200 bases. At present seven genotypes of HBV have been recognized (A-G) and they are distributed geographically. Persons with chronic HBV infection are at increased risk of developing chronic liver diseases, as a cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Thus, the main aim of treatment chronic hepatitis B is to suppress HBV replication before there is irreversible liver damage. Lamivudine, a potent inhibitor of the viral polymerase, has been used with efficacy and safety in order to inhibit the viral replication. However, it has been reported that virus with mutations in the YMDD *motif* (amino acid positions 203 to 206) of the gene that codes for the viral polymerase are resistant to therapy with this drug. The most common mutation is a M204V, a methionine-to-valine substitution at amino acid position 204 of the polymerase, followed by M204I (methionine to isoleucine) mutation. M204V is accompanied by L180M (leucine to methionine) mutation. M204S has recently been described. The main aim of the present

study is to determine the possible genotype relatedness in the development of lamivudine resistance. To determine the incidence of the HBV genotype in chronic patients in Ribeirao Preto, the polymerase gene of 38 patients were amplified and sequenced. Sixteen samples (42.1%) contained HBV of genotype A, 21 (55.3%) contained genotype D and one (2.6%) contained genotype F. These results indicated that the number of patients infected with genotype D were 1.3X higher than those infected with genotype A. On the other hand, the incidence of the genotypes in samples of patients that presented mutations that confer resistance to the treatment was 33.3% (4/12) to genotype A and 66.7% (8/12) to genotype D. In this case, the incidence of the samples by genotype D were 2X higher than samples by genotype A. These results indicated that the presence of these mutations was 1.5X (2/1.3) higher in patients infected with HBV of genotype D. In other words, patients infected with virus of genotype D appeared to have 1.5X more probability to develop mutations that confer resistance than patients infected with genotype A. Also, our results indicated, like others studies, that the rate of YMDD variants increased with the increasing period of treatment, and that the irregularity of the treatment resulted in no response to the therapy.

Defesa: 14/07/2005

Comissão: Prof. Dr. Jonny Yokosawa – FCFRP-USP
Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi – FCFRP-USP
Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca - FMRP-USP

Aluno: Roberta Carreto

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Título: Caracterização molecular de isolados de HIV-1 da região de Ribeirão Preto

Title: Molecular characterization of isolates of HIV-1 from the region of Ribeirão Preto

Resumo: A análise molecular de isolados de HIV-1 de diferentes regiões geográficas do mundo permitiu a classificação deste retrovírus em três grupos genéticos distintos denominados major (M), outiler(O) e non- M, non- O (N), sendo o grupo non- M composto por 09 subtipos (A-D, F-H, J e K) e 13 formas recombinantes circulantes (CRF). A existência destes vários subtipos genéticos é consequência da alta variabilidade entre os diferentes genomas isolados que ocorre devido a alta taxa de mutação do vírus. Sendo assim, a determinação dos subtipos virais é um importante marcador epidemiológico molecular para o seguimento do curso da pandemia global do HIV-1, visto que esta diversidade gera a adaptação do vírus frente a diversos fatores ambientais, farmacológicos e imunológicos. O objetivo deste trabalho foi estudar as características moleculares de isolados virais provenientes de indivíduos HIV positivos da região de Ribeirão preto para estabelecer a epidemiologia molecular do HIV-1 por meio de métodos moleculares de subtipagem viral e análise filogenética e determinar a seqüência de base do genoma de um isolado brasileiro de HIV-1, avaliando as características moleculares. Para isto foram analisadas amostras de DNA obtidas de 78 soropositivos, provenientes da região de Ribeirão Preto. Os subtipos genéticos do HIV-1 foram identificados, utilizando o ensaio da mobilidade do heteroduplex (HMA), sequenciamento automático. Para as 78 amostras avaliadas, o subtipo B foi identificado em 72 (92,3%), o subtipo C em 2 (2,56%), o subtipo F em 1 (1,28%) e o subtipo D em 2 (2,56%), sendo que um isolado apresentou um padrão indeterminado. Pela técnica de PCR, as amostras foram amplificadas para a região gênica env e análise filogenética de 434 pb demonstrou que para as 78 amostras analisadas 92,3% (72) dos isolados foram classificados como subtipo B, 1,28% como subtipo F(1), 3,8% como subtipo C(3) e 2,56 (2) como subtipo D. Juntamente com a análise dos subtipos, foi realizado o método de RFLP para identificação da troca de aminoácidos no topo da alça V3 da gp120 do HIV-1. Neste estudo foi observado a presença de GWGR em 23,61% (17) das 72 amostras do subtipo B. Demonstramos também o sequenciamento parcial do genoma de um dos isolados brasileiro do HIV-1 (RPHIVR101). A escolha deste isolado teve como base após algumas análises a diferença de classificação. Para a região do envelope este classificou-se como D, em posterior análise do gene pol a amostra se agrupou entre os ramos do subtipo B e da CRF 05DF, sugerindo a existência de uma forma recombinante circulante (CRF).

Summary: The molecular analysis of isolates of HIV-1 from different geographical regions of the world allowed the classification of this retrovirus in three different genetic groups called major (M), outiler (O) and non-M, non-O (N), with the group non-M composed of 09 subtypes (AD, FH, J and K) and 13 circulating recombinant forms (CRF). The existence of these different genetic subtypes is a consequence of high variability between different genomes isolated that occurs due to high rate of mutation of the virus. Thus, the determination of viral subtypes is an important marker for molecular epidemiological follow the course of the global pandemic of HIV-1, since this diversity generates the adaptation of the virus against various environmental factors, pharmacological and immunological. This work was studying the molecular characteristics of virus isolated from HIV-positive individuals in the region of Ribeirão Preto to establish the molecular epidemiology of HIV-1 using methods of molecular subtipagem viral and phylogenetic analysis and determine the basic sequence of the genome of a Brazilian isolate of HIV-1, evaluating the molecular characteristics. To this were analyzed DNA samples obtained from 78 HIV positive, from the region of Ribeirão Preto. The genetic subtypes of HIV-1 were identified using the test of the heteroduplex mobility (HMA), automatic sequencing. For the 78 samples evaluated, the subtype B was identified in 72 (92.3%), the subtype C in 2 (2.56%), the subtype F in 1 (1.28%) and subtype D in 2 (2,56%), with an isolated submitted a standard indefinitely. For the PCR technique, the samples

were amplified for the region and env gene from 434 bp phylogenetic analysis showed that for the 78 samples analysed 92.3% (72) of the isolates were classified as subtype B, 1.28% as subtype F (1), 3.8% as subtype C (3) and 2.56 (2) as subtype D. Together with the analysis of the subtypes, was the RFLP method of identification for the exchange of amino acids at the top of the V3 loop of gp120 of HIV-1. This study observed the presence of GWGR in 23.61% (17) from 72 samples of subtype B. Also demonstrate the partial sequencing of the genome of a Brazilian isolates of HIV-1 (RPHIVR101). The choice was based on this isolated after some analyses the difference in ranking. For the region of the envelope that is classified as D, on further analysis of the gene-inch if the sample grouped among the branches of subtype B and CRF 05DF, suggesting the existence of a recombinant stock (CRF)

Defesa: 12/08/2005

Comissão: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas – Hemocentro de Ribeirão Preto – FMRP-USP
Prof. Dra. Yara Maria Lucisano Valim - FCFRP-USP
Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior – FMRP-USP

Aluno: **Sheila Maria Soares**

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Título: Estudos do efeito do extrato hidroalcoólico da polpa dos frutos do *Tamarindus indica* L. na diabetes induzida por aloxana em ratos

Title: Studies of the effect of hydroalcoholic extract from pulp of the fruits of *Tamarindus indica* L. in diabetes induced in rats by aloxana

Resumo: Plantas têm sido extensamente utilizadas como medicamentos tradicionais no tratamento de uma grande variedade de doenças, incluindo diabetes mellitus. A diabetes mellitus é uma doença crônica hereditária e/ou adquirida causada por deficiência na produção de insulina pelo pâncreas, ou por uma baixa secreção de insulina. Recentemente, por inúmeras razões, os medicamentos tradicionais ou alternativos têm ressurgido popularmente para o tratamento de diferentes doenças, como as drogas isoladas de ervas, as quais geralmente não apresentam efeitos tóxicos. O *Tamarindus indica* Linn representa uma delas. O presente trabalho relaciona os efeitos do extrato hidroalcoólico dos frutos de *Tamarindus indica* L. nos níveis séricos de glicose em ratos diabéticos induzidos por aloxana. Os animais foram tratados com ração padrão durante 15 ou 30 dias e receberam água ou extrato de *Tamarindus indica* L. Após 15 dias, o tratamento com o extrato promoveu uma diminuição dos níveis séricos de glicose e triglicerídeos. Entretanto, após 30 dias de tratamento, efeitos similares não foram observados. OGTT foi realizado e evidenciou que a ação antidiabética deste extrato não está relacionada com a taxa de absorção de glicose pelo intestino. Estas evidências indicam um alto potencial do extrato de tamarindo contra o estágio inicial da diabetes. Entretanto, novos estudos são necessários para elucidar o mecanismo dos efeitos hipoglicêmicos e hipolipidêmicos.

Summary: Plant materials have long been used as traditional medicines for the treatment of a wide variety of ailments and diseases, including diabetes mellitus. Diabetes mellitus is chronic disease caused by inherited and/or acquired deficiency in production of insulin by the pancreas, or by the ineffectiveness of the insulin produced. From various reasons, in recent years, traditional and complementary medicine have been an upsurge in its popularity for the treatment of different diseases as herbal drugs are generally out of toxic effect. *Tamarindus indica* Linn is one of them. The present study addressed the effects of the hydroalcoholic extract from *Tamarindus indica* Linn fruit on glucose serum levels in aloxana-induced diabetic rats. Animals were given their standard chow during 15 or 30 days, also receiving water or *Tamarindus indica* Linn extract. After 15 days, the treatment with the extract led to decrease in the levels of serum glucose and triglycerides. However, after 30 days of treatment the

similar effects were not observed. OGTT was performed and showed that antidiabetic action of this extract is not due to its effect on the intestinal rate of glucose absorption. These evidences taken together indicate a high potential of tamarind extracts activity against the diabetes in early stage. However, further investigations are necessary to elucidate the detailed mechanism of hypoglycemic and hypolipidemic effects.

Defesa: 01/09/2005

Comissão: Prof. Dr. Sergio Akira Uyemura – FCFRP-USP
Profa. Dra. Marina Lemos dos Reis - FCFRP-USP
Prof. Dr. Sergio Britto Garcia – FMRP-USP