



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

cafs

## **MESTRADO - 2006**

**Aluno:** Amanda Rehder

**Orientador:** Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini

**Título:** Caracterização da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em estafilococos mediada pelos operons *mecA* e *blaZ*

**Title:** Characterization of resistance to  $\beta$ -lactams in staphylococci mediated by *mecA* and *blaZ* operons

**Resumo:** Estafilococos são freqüentemente resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos devido à produção de  $\beta$ -lactamase e/ou pela produção de uma proteína ligadora de penicilina (PBP2a) com baixa afinidade por estes antibióticos.  $\beta$ -lactamase e PBP2a são codificadas por genes localizados nos operons *mec* e *bla*, respectivamente. A detecção fenotípica da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, bem como a detecção dos genes *mecA* e *blaZ* e os controladores da expressão dos mesmos foram objetivos deste estudo. A caracterização fenotípica da resistência foi feita por determinação da concentração inibitória mínima (CIM), pesquisa da produção e hiperprodução de  $\beta$ -lactamase; a caracterização genotípica foi feita pela reação da polimerase em cadeia, pesquisando-se os genes *blaZ*, *blaR1*, *blaI* (operon *bla*) e *mecA*, *mecR1* e *mecl* (operon *mec*). A manutenção do gene *mecA* em linhagens estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  também foi avaliada. Os testes fenotípicos indicaram alta resistência à penicilina e oxacilina entre os estafilococos, sendo que a determinação da CIM pelo método de diluição em ágar mostrou-se eficiente na detecção de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos. Resistência à penicilina entre os estafilococos coagulase negativos, mediada pela produção de  $\beta$ -lactamase, não foi eficientemente detectada pela nitrocefina. Nenhuma linhagem de estafilococos foi hiperprodutora de  $\beta$ -lactamase. A presença dos genes *blaZ* e *mecA* está altamente correlacionada com a expressão fenotípica da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, entretanto, estes genes podem estar presentes em linhagens de estafilococos sensíveis. Estafilococos com fenótipo e genótipo discrepantes quanto à resistência aos  $\beta$ -lactâmicos possuem o gene repressor *blaI*, enquanto a presença dos genes *blaR1*, *mecR1* e *mecl* é variável. A perda do gene *mecA* foi detectada em alguns estafilococos estocados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dados sobre os níveis de resistência a antimicrobianos entre patógenos prevalentes em hospitais, bem como estudos sobre os mecanismos de resistência apresentados pelos mesmos têm importância relevante no contexto do uso racional de antimicrobianos e no fornecimento de subsídios para a síntese de novas drogas.

**Summary:** Resistance to  $\beta$ -lactams among staphylococci is mediated by either one or both mechanisms: production of  $\beta$ -lactamase or production of an altered target penicillin-binding protein, PBP2a.  $\beta$ -lactamase and PBP2a are encoded by genes located in two genetic elements, *bla* and *mec* operon. The study of mechanisms of  $\beta$ -lactams resistance as well as the control of their genic expression was the main objective in this investigation. Phenotypic oxacillin resistance was characterized by the minimum inhibitory concentration (MIC) and production and hiperproduction of  $\beta$ -lactamase. Genes *blaZ*, *blaR1*, *blaI* (operon *bla*) and *mecA*, *mecR1*, *mecl* (operon *mec*) were investigated by the polymerase chain reaction (PCR). Maintenance of the *mecA* gene in strains stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  was evaluated by the same tests performed before storage. The agar dilution method showed good performance for detecting  $\beta$ -lactams resistance. Resistance to oxacillin and penicillin was high among

staphylococci isolates. However, coagulase negative staphylococci resistance to penicillin mediated by  $\beta$ -lactamase was not efficiently detected by nitrocefin. None of the staphylococci strains was a hiperproducer of  $\beta$ -lactamase. Genes *blaZ* and *mecA* are present in oxacillin resistant strains but susceptible strains also harbor these genes. Staphylococci strains with phenotype and genotype incongruence related to  $\beta$ -lactams resistance harbored the *blaI* gene. However, the presence of genes *blaR1*, *mecR1* and *mecI* among the strains was variable. Some staphylococci strains stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  lost the *mecA* gene. Data about levels of antibiotic resistance among pathogenic microorganisms as well as understanding of the resistance mechanisms involved contribute to development of new drugs and their correct use.

**Defesa:** 31/08/2006

**Comissão:** Profa. Dra. Ana Lucia da Costa Darini – FCFRP-USP  
Profa. Dra. Lucia Martins Teixeira - UFRJ  
Prof. Dr. Roberto Martinez - FMRP-USP

**Aluno:** **Andresa Piacezzi Nascimento**

**Orientador:** Izabel Yoko Ito

**Título:** Avaliação do nível de contaminação de escovas dentais em função dos anti-sépticos bucais

**Title:** Assessment of the level of contamination of brushes dental according to the oral anti-septic

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do Periogard® e do Plax®, sob a forma de spray, na formação de biofilme de estreptococos do grupo mutans nas cerdas de escovas dentais utilizadas uma única vez, durante 2 minutos, sem uso de dentífrico. Participaram do estudo 53 acadêmicos matriculados no 5º período do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Este trabalho foi realizado em três etapas, com intervalo de uma semana entre cada uma. Os anti-sépticos e a água destilada esterilizada (grupo controle) foram utilizados em todas as etapas, sob a forma de rodízio, por grupos de indivíduos diferentes. Após a escovação, cada participante efetuou a lavagem e secagem da escova de maneira habitual. A seguir, cada solução foi borrifada 6 vezes (volume de aproximadamente 0,6mL) sobre as cerdas de cada escova. Após 3 horas à temperatura ambiente, as escovas foram colocadas individualmente em tubos de ensaio contendo 10mL de caldo sacarose bacitracina (seletivo enriquecedor para estreptococos do grupo mutans). Após a incubação a 37°C durante 3 a 4 dias, as escovas foram retiradas do tubo e o excesso do meio de cultura eliminado. A seguir, as colônias/biofilmes de estreptococos do mutans sobre as cerdas das escovas foram contados em estereomicroscópio sob luz refletida. Em 38 casos ocorreu a formação de biofilme, quando da aplicação do spray de água destilada esterilizada. O Periogard® e o Plax® inibiram a formação do biofilme nas cerdas de 97,4% e 84,2% das escovas dentais, respectivamente. Ao comparar o efeito desses anti-sépticos na desinfecção de escovas dentais, nota-se que o Periogard® é mais eficaz que o Plax® ( $p < 0,01$ ). É necessária a realização de estudos adicionais para avaliar a influência da fórmula farmacêutica de diferentes produtos odontológicos contendo triclosan na desinfecção/sanificação de escovas dentais.

**Summary:** The objective of this study was to evaluate the effect of Periogard® and Plax®, in spray, on biofilm formation of mutans group streptococci on the toothbrushes bristles used once, during 2 minutes, without dentifrice. Participated of the study 53 university students of FCFRP-USP. This work was performed in three steps, with interval of the one week among each one. Antiseptics and distilled sterilized water (control group) were randomly assigned so that all the solutions could be used in all different steps by different person's groups. After toothbrushing, each participant rinsed and dried the toothbrush as usually. Then, each solution was sprayed 6 times (volume about 0.6mL) over the toothbrush bristles. After 3 hours at room temperature, toothbrushes were put in test tubes containing 10mL of sacrose bacitracin broth (selective to mutans group streptococci). After incubation at 37°C for 3-4 days, toothbrushes were taken off. Then, colonies/biofilms of mutans group streptococci on the bristles was counted by stereomicroscope under reflected light. In the control group, 38 toothbrushes presented biofilm formation. Periogard® and Plax® inhibited biofilm formation on the bristles of 97.4% e 84.2% toothbrushes, respectively. Comparing the effect of these antiseptics on toothbrushes disinfection, Periogard® was more effective than Plax® ( $p < 0.01$ ). It is necessary to make others studies to evaluate the influence of the pharmaceutical formula of different triclosan dental products on toothbrushes disinfection.

**Defesa:** 03/03/2006

**Comissão:** Profa. Dra. Izabel Yoko Ito - FCFRP-USP  
Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins - UNIFRAN  
Profa. Dra. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto – FCF-UNESP

**Aluno:** Carlos Eduardo Mendes D'Angelis

**Orientador:** Elaine Cristina Pereira de Martinis

**Título:** Purificação e caracterização parcial da bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei* 1

**Title:** Purification and partial characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* 1

**Resumo:** Há crescente preocupação na indústria de alimentos para o controle de microrganismos psicrotóxicos causadores de toxinfecções ou deteriorantes. Uma alternativa promissora para aumentar a segurança microbiológica dos alimentos é o biocontrole, com o uso principalmente, de bactérias lácticas (BAL) e/ou seus metabólitos para inibir microrganismos indesejáveis. Muitas cepas de BAL podem sintetizar e excretar peptídeos antimicrobianos denominados bacteriocinas, mas até o momento, a nisina é a única bacteriocina permitida para uso na indústria de alimentos. Há limitações de uso desta bacteriocina devido à sua inativação em produtos cárneos. Neste sentido, há necessidade de busca de outras bacteriocinas para utilização bem sucedida em carnes. *Lactobacillus sakei* 1, é uma BAL isolada em nosso laboratório, a partir de lingüiça suína e é capaz de inibir *Listeria monocytogenes*, por meio da produção de bacteriocina. Neste projeto, a bacteriocina produzida por *L. sakei* 1 foi purificada empregando-se extração ácida e cromatografias por troca catiônica, interação hidrofóbica e cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Preparações contendo o peptídeo parcialmente purificado tiveram a massa molecular estimada em 3420 Da, por SDS-PAGE, com revelação pela prata e com microrganismo indicador. A bacteriocina purificada também foi analisada por espectrometria de massas (MALDI-TOF-MS) e a sua massa molecular foi determinada em 4438,83 Da. Aproximadamente 31 resíduos de aminoácidos N-terminal do peptídeo foram seqüenciados via degradação de Edman, apresentando a seqüência YGNGV, comum na parte N-terminal de bacteriocinas pertencentes à Classe IIa. O peptídeo purificado foi denominado "sakacina 1".

**Summary:** The control of pathogenic and spoilage bacteria is of great concern to the food industry. Biopreservation approaches using lactic acid bacteria (LAB) and/or their metabolites is an important alternative to improve food safety. LAB can synthesize and excrete antimicrobial peptides denominated bacteriocins, but up to now only nisin has been used commercially as food preservative. There are limitations of use of this bacteriocin due to its inactivation in meat products. Current research on LAB bacteriocins are conducted aiming to broad their application as natural food preservatives. *Lactobacillus sakei* 1, is a LAB previously isolated in our laboratory from pork sausage and it is capable to inhibit *Listeria monocytogenes*, by bacteriocin production. In this project, *L. sakei* 1 was grown in MRS broth and its bacteriocin was extracted by adsorption on its own cells and purified by cation-exchange, hydrophobic interaction and HPLC reversed-phase chromatography. Estimates of molecular weight (3,420 Da) of the partially purified peptide were carried out, using SDS-PAGE stained with by silver stain and overlay with indicator microorganism. The purified bacteriocin was also analysed by mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and molecular weight was determined as 4,438.83 Da. Approximately 31 N-terminal amino acid residues were sequenced by Edman degradation and the motif YGNGV (commonly found in Class IIa bacteriocins) was observed in the N-terminal sequence. The peptide purified was named as "sakacin 1".

**Defesa:** 29/06/2006

**Comissão:** Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis – FCFRP-USP  
Prof. Dr. Augusto Cesar Cropanese Spadaro – FCFRP-USP  
Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco – FCF-USP

**Aluno:** Daniela Isabel de Souza

**Orientador:** Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

**Título:** Papel dos glicocorticóides nos mecanismos de evasão do *Strongyloides venezuelensis*

**Title:** Role of glucocorticoids in the mechanisms of circumvention of *Strongyloides venezuelensis*

**Resumo:** As strongiloidíases são parasitoses intestinais causadas por várias espécies do gênero *Strongyloides* e apresentam distribuição cosmopolita. Dados da literatura mostram que o uso prolongado de glicocorticóides por pacientes com diferentes patologias pode levar à imunossupressão, e se esses indivíduos estiverem infectados cronicamente por *S. stercoralis*, pode haver disseminação dos parasitas. Os mecanismos pelos quais os glicocorticóides favorecem esse fenômeno são desconhecidos até o momento. Assim, o objetivo deste projeto foi verificar o papel dos glicocorticóides nos mecanismos de evasão de *Strongyloides* sp. Sendo assim, investigamos o efeito do tratamento com glicocorticóide no total de leucócitos, células mononucleares e eosinófilos no sangue e no recrutamento dessas células para o espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal de ratos infectados com 9000 larvas (L<sub>3</sub>) de *Strongyloides venezuelensis*, após 1, 3, 5, 7, 14 e 21 dias. Determinamos ainda o efeito do tratamento diário com dexametasona no parasitismo, fecundidade e disseminação de fêmeas e larvas para diferentes órgãos. Nossos resultados demonstraram que esse helminto induziu aumento de leucócitos totais, eosinófilos e células mononucleares no sangue, lavado broncoalveolar e cavidade peritoneal. A infecção induziu eosinofilia no parênquima pulmonar e na mucosa intestinal e também induziu aumento da enzima peroxidase de eosinófilos no lavado broncoalveolar e cavidade peritoneal. O tratamento com dexametasona inibiu significativamente o aumento das células inflamatórias nos três compartimentos avaliados, porém induziu aumento de neutrófilos no sangue. Também inibiu o recrutamento de eosinófilos para a mucosa intestinal e parênquima pulmonar. Os animais infectados e tratados diariamente com dexametasona mantiveram o parasitismo e apresentaram disseminação das formas parasitárias para vários órgãos como pulmões, baço, rins, coração, fígado e cérebro, e aumento de ovos recuperados nas fezes. Na análise histopatológica do parênquima pulmonar dos animais infectados e tratados também evidenciamos quadro de disseminação, ou seja, observamos presença de larvas parasitas no 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia após infecção, com grande quantidade de cutículas, mostrando que as larvas estavam sofrendo muda (ecdise) nesse órgão. A dexametasona não influencia de modo significativo o tamanho das suas formas evolutivas do *S. venezuelensis*, uma vez que não observamos diferença tanto no tamanho das larvas quanto no das fêmeas quando incubadas *in vitro* com meio e estimuladas com dexametasona, ou quando recuperadas dos diferentes grupos experimentais (*in vivo*). Além disso, tanto as larvas quanto as fêmeas parasitas sintetizam os hormônios "corticosterona-like" e "ecdisterona-like". O tratamento dos animais com dexametasona induziu aumento desses hormônios. Nossos resultados sugerem que o aumento do parasitismo resulta não só da ação do corticóide no hospedeiro, mas também devido à ação direta sobre o parasita, pois demonstramos que tanto as larvas quanto as fêmeas expressam receptor para glicocorticóides. A interação entre esses fatores resultaria na hiperinfecção e disseminação do parasita.

**Summary:** Strongyloidiasis is an enteric parasitosis caused by any one of a number of *Strongyloides* spp and presenting a cosmopolitan distribution. Various studies involving patients with diverse pathologies have shown that prolonged use of glucocorticoids can lead to immunosuppression. In studies of such individuals who were also chronically infected with *S. stercoralis*, glucocorticoid-related immunosuppression has been correlated with parasite proliferation. The mechanisms by which glucocorticoids participate in this phenomenon are as yet unknown. The aim of this project was to determine the role that glucocorticoids play in *S. venezuelensis* evasion mechanisms. To that end, we investigated the effect of glucocorticoid treatment on total leukocytes, eosinophils and mononuclear cells in the blood, as well as in the peritoneal cavity fluid (PCF) and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of Wistar rats at 1, 3, 5, 7, 14 and 21 days after inoculation with 9000 third-stage *S.*

*venezuelensis* larvae. We also conducted *in vitro* experiments, in which *S. venezuelensis* larvae were incubated in culture medium and stimulated with dexamethasone. *In vivo*, we determined the effect that daily treatment with dexamethasone had on parasitism and fecundity, as well as on the dissemination of females and larvae to different organs. Our results demonstrate that this helminth induced greater numbers of total leukocytes, eosinophils and mononuclear cells, not only in the blood but also in the PCF and BALF. The infection induced eosinophilia in the lung parenchyma and intestinal mucous membrane, as well as inducing higher PCF and BALF levels of the eosinophil peroxidase. Dexamethasone treatment significantly inhibited the increase in the numbers of inflammatory cells in the three compartments appraised, although it induced neutrophilia in the blood. Administration of dexamethasone also inhibited eosinophil recruitment to the intestinal mucosa and lung parenchyma. Infected animals receiving daily doses of dexamethasone maintained the parasitism throughout the study period, presenting proliferation of the parasite along the pathways to several organs, such as the lungs, spleen, kidneys, heart, liver and brain, and higher numbers of eggs in the feces. In the histopathological analysis of the lung parenchyma of the infected, treated animals, we also found parasite proliferation. On post-inoculation days 14 and 21, we observed parasite larvae, with an abundance of cuticles, in the lung parenchyma, showing that the larvae are undergoing ecdysis (shedding) in this organ. Dexamethasone treatment did not significantly influence the size of the *S. venezuelensis* larvae or females – *in vitro* or *in vivo*. In addition, we found that the larvae and females expressed glucocorticoid receptors in response to dexamethasone administration. Furthermore, we found that levels of “corticosterone-like” and “ecdysterone-like” hormones, both of which are synthesized by *S. venezuelensis* larvae and females, are elevated after treatment with dexamethasone. Our findings suggest that the increased parasitism seen in infected patients treated with glucocorticoids is related not only to their effect on the host but also to the direct effect that they have on the parasite. The interaction of these factors can result in hyperinfection and wider dissemination of the parasite.

**Defesa:** 25/04/2006

**Comissão:** Profa. Dra. Lucia Helena Faccioli - FCFRP-USP  
Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior - FCFRP-USP  
Prof. Dr. Bernardo Boris Jorge Vargaftig - ICB



**Aluno:** **Daniele da Silva Ferreira**

**Orientador:** Sérgio de Albuquerque

**Título:** Ácido ursólico e ácido oleanóico como potenciais agentes para o combate de *Trypanosoma cruzi*

**Title:** Ursolic acid and oleanoic acid like potential agents against *Trypanosoma cruzi*

**Resumo:** A dificuldade do combate a *Trypanosoma cruzi*, está relacionada às interações existentes entre o parasito e o hospedeiro, sendo que até o momento, nenhum medicamento tem demonstrado eficácia ao combate ao parasito. Assim, a triagem de extratos derivados de plantas, pode resultar em um caminho promissor para o encontro de uma nova substância capaz de atuar sobre o parasito. Nesse sentido avaliamos a capacidade tripanocida dos triterpenos, ácido ursólico (AU), ácido oleanóico (AO), isolados do extrato diclorometano obtido da espécie vegetal *Miconia albicans*, e sal derivado de AU. Observou-se que AU e seu sal derivado apresentaram melhor atividade tripanocida *in vitro* sobre as formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Para a mistura AU+AO observamos um comportamento de efeito sinérgico entre as duas substâncias, demonstrando assim melhor atividade para a cepa Bolívia. Sobre as formas amastigotas da cepa Y, a mistura AU+AO foi o composto que apresentou melhor atividade, quando comparado às demais substâncias. Em relação à cepa Bolívia a mistura AU+AO demonstrou atividade similar à encontrada para o controle positivo. Já o triterpeno AO foi a substância que apresentou menor porcentagem de lise parasitária. Essas substâncias também foram avaliadas *in vivo*, utilizando como modelo experimental camundongos Balb/c, machos e infectados com  $2 \times 10^4$  formas tripomastigotas. A mistura AU+AO, o sal derivado de AU e o triterpeno AO provocaram significativa redução do número de parasitas e deslocamento do pico parasitêmico. Uma atividade biológica significativa foi observada para o AU, embora não tenha ocorrido deslocamento do pico parasitêmico para a cepa Y de *T. cruzi*. Para a cepa Bolívia, a mistura AU+AO não apresentou atividade significativa, entretanto, a redução do número de parasitas foi mais significativa quando comparada aos controles. AO, a exemplo de AU, não apresentou redução do número de parasitas. Para o sal derivado de AU, podemos observar uma exacerbação da parasitemia, e após o pico parasitêmico observa-se uma redução discreta da parasitemia. A cura parasitológica não foi observada em nenhum dos grupos avaliados.

**Summary:** The difficulties in effectively eliminate *Trypanosoma cruzi* in the host, is probably related to the interactions between host and parasite, and until now there is no specific drug with specific activity against *T. cruzi*. So the search for new compounds is a constant goal, and plant extract derivatives can become a promising alternative in finding substances with potential activity. In the present study we evaluated the trypanocidal activity of the triterpenes ursolic acid (UA) and oleanoic acid (OA), both isolated from a dichloromethane extract from the vegetal species *Miconia albicans*. The potassium salt derivative of ursolic acid was also prepared and tested. As experimental model, males Balb/c mice and were i.p. infected with  $2 \times 10^4$  trypomastigote of the Y and Bolivia strains of *T. cruzi*, respectively. For the *in vitro* tests, the mixture of UA and OA showed a synergic trypanocidal effect, mainly observed for Bolivia strain. A significant trypanocidal activity was observed for UA and potassium salt derivative of ursolic acid against tripomastigote forms of Y strain of *T. cruzi*. For amastigote forms of the Y strain, mixture of UA + OA displayed enhanced capacity to eliminate these forms when compared to other compounds used in this experiment. For Bolivia strain the trypanocidal activity observed for UA + OA was similar to those for Benznidazol. The triterpene OA was the only substance which displayed the least reduced parasite lysis percentage for Bolivia strain. In the *in vivo* assays using the Y strain, all substances showed a statistical significant reduction in the number of parasites with peak of parasitemia postponed. A trypanocidal activity was also observed for UA potassium salt, although without causing dislocation of the parasitemic peak. No significant reduction was observed for Bolivia strain, when the mixture UA + OA were used, although the reduction was observed in comparison with control group

of animals. The triterpene OA did not showed parasite reduction in the *in vivo* tests. Enhanced number of parasites was observed in animals treated with the UA potassium salt. The total parasite elimination was not achieved in none of the tested groups.

**Defesa:** 26/04/2006

**Comissão:** Prof. Dr. Sergio de Albuquerque - FCFRP-USP  
Profa. Dra. Ana Amelia Carraro Abrahão - FCFRP-USP  
Prof. Dr. Wilson Roberto Cunha - UNIFRAN



**Aluno:** Danyelle Romana Alves Rios

**Orientador:** Profa. Dra. Maria Regina Torqueti Tolo

**Título:** Isoflavonas: efeitos sobre o sistema de coagulação - fibrinólise e perfil lipídico de mulheres em pós-menopausa

**Title:** Isoflavones: effects on the coagulation and fibrinolytic system and lipid profile in postmenopausal women

**Resumo:** A incidência de doenças cardiovasculares (DCV) em mulheres na menopausa torna-se a maior causa de morbidade e mortalidade. Isto está associado com alterações não favoráveis do perfil lipídico, dos fatores da coagulação e fibrinólise e da função vascular, provenientes da diminuição da atividade estrogênica. A terapia de reposição hormonal estroprogestiva prescrita para amenizar os sintomas da menopausa e para prevenir DCV e osteoporose tem sido muito debatida após alguns estudos relatando a maior predisposição ao câncer de mama e a não proteção contra doenças cardíacas. Na tentativa de buscar um tratamento para os sintomas da menopausa com menos efeitos colaterais, destacamos a isoflavona, composto natural extraído da proteína da soja (*Glycine Max*) que apresenta atividade estrogênica. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da isoflavona por via oral sobre as variáveis hemostáticas e perfil lipídico de mulheres saudáveis na pós-menopausa. A avaliação da coagulação-fibrinólise foi feita utilizando os seguintes parâmetros: TP, TTPA, Fatores VII e X; Fibrinogênio; TAT; F1+2; Antitrombina; Proteína C; Proteína S total e livre; Plasminogênio; PAI-1 e Dímeros-D. Já o perfil lipídico foi avaliado pelos parâmetros bioquímicos: colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL) e triglicérides. O monitoramento da terapia foi feito avaliando os hormônios FSH e  $\beta$ -estradiol das pacientes. A concentração urinária de isoflavona (genisteína e daidzeína) foi avaliada por HPLC para detectar a absorção e adesão ao tratamento pelas voluntárias. Quarenta e sete mulheres na pós-menopausa (idade: 47-66 anos) foram avaliadas antes e após seis meses do tratamento proposto [40mg de isoflavona (Isoflavin Beta<sup>®</sup>/GALENA) (n=25) ou 40mg de caseína (n=22)]. Os níveis das variáveis hemostáticas não alteraram significativamente em ambos os grupos, porém, no grupo isoflavona, houve uma redução significativa do F1+2 (11,5%); em ambos os grupos houve redução significativa da antitrombina, da proteína C e da proteína S livre, porém essa alteração não foi diferente entre os grupos. Aumento significativo nos níveis dos dímeros-D foi observado apenas do grupo tratado, sendo que, no grupo placebo não houve alteração. Os níveis de plasminogênio não alteraram em ambos os grupos; já os níveis de PAI-1 aumentaram significativamente apenas no grupo placebo. As concentrações dos lipídios séricos, colesterol total e LDL, reduziram de forma não significativa em ambos os grupos. Houve um aumento significativo de HDL no grupo isoflavona (8,1%), mas esta alteração não foi diferente estatisticamente do grupo placebo (13,8%). Já os níveis de VLDL e triglicérides aumentaram não significativamente em ambos os grupos. As dosagens de FSH e estradiol das pacientes serviram para monitorar a terapia, não encontrando nenhuma alteração em ambos os grupos. Este estudo sugere que a isoflavona não tem efeito biológico significativo sobre os parâmetros analisados, porém, mais pesquisas serão necessárias para definir a segurança e a eficácia desse medicamento.

**Summary:** The incidence of cardiovascular disease (CVD) is associated with unfavorable alterations of the lipid profile and haemostasis, proceeding from decrease of the estrogenic activity in postmenopausal women. Hormonal Replacement Therapy (HRT) has been much debated because some studies show HRT increases breast cancer predisposition and it does not protect against cardiac diseases. Attempting to reach treatment to menopause symptoms, minimizing side effects, we suggest isoflavone, a natural compound extracted from soy (*Glycine max*) protein that has a effect estrogen like. To evaluate the effects of the isoflavone on haemostasis and lipids levels in healthy postmenopausal women. In this double blind placebocontrolledstudy, 47 postmenopausal women of age 47-66 years received 40mg Isoflavone-GALENA<sup>®</sup> (n=25) or 40mg casein placebo (n=22). Levels of hemostatic factors

PT, APTT, activity factors VII and X, and fibrinogen, TAT, F1+2, antithrombin, protein C, total and free protein S, plasminogen, PAI-1 and D-dimers and lipids [total cholesterol/TC, triglycerides/TG, High Density Lipoprotein/HDL, Low Density Lipoprotein/LDL and Very Low Density Lipoprotein/VLDL] were measured at baseline and 6 months. The therapy were examined for FSH e  $\beta$ -estradiol levels. Urinary isoflavone concentrations (genistein and daidzein) were measured as marker of both compliance and absorption using high performance liquid chromatography. Levels of hemostatic variables did not change significantly throughout the study in isoflavone group; however isoflavone group experienced statistically significant reduction in plasma concentration of F1+2 (11,5%); both groups experienced statistically significant reduction in antithrombin, protein C and free protein S levels. Significant increase in D-dimers were observed only in the isoflavone group. PAI-1 levels increased significantly in the placebo group. Levels of lipids (LDL and TC) decreased no significant similarly in both groups. HDL decreased significantly in the isoflavone group (8,1%), but the change was not different to the placebo group (13,81%). Furthermore, in both groups were increased no significant of levels VLDL and TG. The results of the current study do not support biologically significant estrogenic effects of isoflavone on parameters assessed, however further research will be necessary to definitively asses the safety and efficacy of isoflavone.

**Defesa:** 31/08/2006

**Comissão:** Profa. Dra. Maria Regina Torqueti Toloï – FCFRP-USP  
Profa. Dra. Eliana Aguiar Petri Nahas - UNESP - Botucatu  
Profa. Dra. Ana Maria de Souza – FCFRP-USP

**Aluno:** Eduardo Osório Frare

**Orientador:** Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

**Título:** Avaliação do efeito da suplementação com Hormônio do Crescimento na resposta imune em ratos Wistar infectados com *Trypanosoma cruzi*

**Title:** Evaluation of the effect of supplementation with growth hormone in the immune response in rats Wistar infected with *Trypanosoma cruzi*

**Resumo:** O Hormônio do Crescimento (GH) produzido pela adeno-hipófise possui múltiplas funções tais como o crescimento e manutenção da massa óssea e muscular, redução da quantidade de gordura corpórea, além de comprovada ação imuno moduladora. A maioria das células imunes expressa receptores para GH e Insuline Growth Hormone – I (IGF-I), o que indica uma relação entre a função imune e o eixo somatotrópico. Em modelo murino, GH estimula a proliferação de células T, hiperplasia tímica e geração de células CD<sub>4</sub><sup>+</sup>. Por outro lado, camundongos “Snell-Bag dwarf”, que exibem uma função anormal da pituitária apresentam defeitos profundos na imunidade regida por células T e isto poder ser revertido pela adição de GH. Baseado nessas premissas, o presente trabalho teve por objetivos o estudo do efeito da administração de GH sobre a resposta imune de ratos machos Wistar infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*. A administração de GH ocasionou uma redução marcante da parasitemia, leucocitose com perfil típico linfocitário, aumento do peso cardíaco e dos órgãos linfóides como timo e baço estimulação da mitogênese de células da medula. Quanto à resposta imune celular houve um direcionamento desta para o tipo Th-1 com substancial aumento de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , NO e IL-2. A resposta imune humoral foi avaliada através da porcentagem de anticorpos líticos que se mostrou aumentada ao redor do 30º dia. A histologia do coração revelou menor quantidade de ninhos de formas mastigotas e de infiltrado inflamatório com relativa manutenção da arquitetura histológica do órgão. Quanto ao baço e timo, ambos revelaram um processo de ativação celular. Os dados deste estudo demonstram, portanto, que o GH, mesmo na dosagem baixa utilizada, promove uma otimização da resposta imune em ratos Wistar infectados com *Trypanosoma cruzi*.

**Summary:** Growth hormone, also known as somatotropin, is a protein hormone of about 191 amino acids that is synthesized and secreted by cells called somatotrophs in the anterior pituitary. Growth hormone controls several complex physiologic processes, including growth, protein, lipid and carbohydrate metabolism, besides a well proven immune stimulatory effect. Most of the immune competent cells display receptors for GH and IGF-1, indicating a relationship between immune functions and the somatotrophic axis. In murine models, GH stimulates the in vitro proliferation of T cells. Some authors describe that Snell-Bag dwarf mice, animals which display an abnormal pituitary function, show deep impaired cellular immunity that can be reverted by GH administration. The same authors also describe a tymic hyperplasia induced by GH and a probable involvement of IL-7 in the process of tymus development. Based on these statements, this work has the aim to study the role of GH administration on the immune response of male Wistar rats infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. GH therapy triggered a marked reduction of parasitemia, leucocytosis with a typical lymphomonocitary profile, enhanced heart, spleen and thymus weight and a stimulatory effect on the production of immature cells from bone merrom. Animals displayed a TH-1 cellular immune response with high levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , NO and IL-2. Humoral immune response was evaluated through lytic antibody percentage that displayed enhanced values around 30th. day after infection. Heart hystopathology revealed a scarce number of amastigote burdens as well as inflammatory infiltrate and a reasonable maintenance of the hystological architerture of the organ. Concerning to spleen and thymus, a hyperproliferation of cellular components was observed. In general we can conclude that the low doses of GH used in this experiment triggered an enhanced immune cellular and humoral response controlling the development of the experimental infection.

**Defesa:** 25/05/2006

**Comissão:** Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior - FCFRP-USP  
Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo Franci - FORP-USP  
Profa. Dra. Ana Patricia Yatsuda Natsui - FCFRP-USP

**Aluno:** **Fabrcia Heleno Santello**

**Orientador:** Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior

**Título:** Efeito da administração de melatonina oral na evolução da doença de chagas experimental

**Title:** Effect of administration of oral melatonin in evolution of the experimental Chagas disease

**Resumo:** A doença de Chagas é um problema de saúde pública, com dados preocupantes do número de pessoas contaminadas e que ainda irão se contaminar. O objetivo desta investigação é avaliar o efeito da melatonina sobre o sistema imune na infecção chagásica experimental. Produzida pela glândula pineal possui várias ações fisiológicas, entre elas a mais importante, controlar o ritmo circadiano na grande maioria dos seres vivos. A melatonina foi administrada por via oral, tendo seu efeito avaliado através da quantificação dos níveis parasitêmicos, leucograma, histopatologia cardíaca e por ensaios imunológicos como IFN, TNF, IL-2, IL-12. A parasitemia foi drasticamente diminuída nos animais infectados e tratados com melatonina refletindo em uma diminuição ou quase ausência da presença de ninhos de amastigotas nas fibras cardíacas desses animais. A melatonina promoveu uma leucocitose com aumento dos neutrófilos e linfócitos. Não foi observada morte em nenhum dos grupos infectados tratados ou não com melatonina. Os ensaios imunológicos mostraram que as citocinas quantificadas apresentaram uma ação imunoestimuladora aumentada em relação aos grupos infectados que certamente foi responsável pela diminuição da carga parasitária sanguínea e tecidual. Dessa forma conclui-se que a melatonina exerceu um papel imunoestimulador importante, agindo sobre o eixo HHA que se refletiu em uma melhor resposta do hospedeiro durante o curso da infecção experimental.

**Summary:** Chagas' disease is still considered a major problem in public health, with an alarming number of bearing parasite people and the risk of future contamination. The aim of this investigation is to evaluate a possible immunostimulatory effect of melatonin during the evolution of the experimental disease in Wistar rats infected with the Y strain of *T. cruzi*. Produced by pineal gland, it has a wide range of physiological functions, among them to control the circadian rhythm in most of the species. In this work melatonin was orally administrated being its effects evaluated by the number of blood trypomastigotes, leucogram, heart hystopathologyn and immunologic assays such IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-12. Parasitemia was drastically reduced in melatonin treated infected animals consequently leading to a drop in the number of amastigoter burdens being sacarcely found among heart fibers. Melatonin promoted a leucocytosis with enhanced levels of neutrophils and lymphocytes. Absence of death was observed in all groups. Immuno-enhanced effects were observed with assays of IL-2, IL12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . when compared to non treated animals. According to our data we conclude that Melatonin displayed an immunostimatory effect over the HHA axis, reducing blood and tecidual parasite consequently avoiding parasite replication during the evolution of the experimental infection in rats.

**Defesa:** 24/03/2006

**Comissão:** Prof. Dr. José Clóvis do Prado Júnior – FCFRP-USP  
Prof. Dr. Sérgio Zucoloto – FMRP-USP  
Profa.Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão – FCFRP-USP

**Aluno:** João Alexandre Três Pancoto

**Orientador:** Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha

**Título:** Estudo das alterações cardiovasculares e da secreção de vasopressina em sepse induzida por ligadura e perfuração cecal

**Title:** Study of cardiovascular changes and secretion of vasopressin in sepsis induced by cecal ligation and puncture

**Resumo:** Nas fases iniciais do choque séptico, ocorre um aumento das concentrações plasmáticas de vasopressina (AVP) que, não persiste nas fases finais quando ocorre uma deficiência na secreção de AVP, a despeito da hipotensão severa. Uma das hipóteses para essa deficiência é que seja devida ao enfraquecimento do baroreflexo que pode ocorrer já nas fases iniciais do choque séptico. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações cardiovasculares e as concentrações plasmáticas de vasopressina (AVP) durante as fases iniciais da sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP). Ratos Wistar foram submetidos à CLP (10 perfurações cecais) ou à cirurgia fictícia e foram divididos em dois grupos: a) grupo 1, teve a pressão arterial registrada por um período de 5 horas e posteriormente analisado o baroreflexo espontâneo e a análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial a fim de avaliar a integridade do baroreflexo e do sistema nervoso autônomo. b) grupo 2, os animais foram decapitados nos períodos de 0, 2, 4, 6 e 8 horas após CLP ou cirurgia fictícia e o sangue foi coletado para determinação de hematócrito, osmolalidade, sódio e AVP plasmáticos. As determinações do hematócrito, osmolalidade e as dosagens de sódio, não mostraram alterações significativas entre os grupos. Ocorreu hipotensão 1 hora após CLP e que persistiu durante as 5 horas de registro sendo acompanhada de aumento da frequência cardíaca. As concentrações plasmáticas de AVP aumentaram logo após CLP, alcançando um pico em 4 horas, porém retornando aos níveis basais após 8 horas. O baroreflexo espontâneo se mostrou atenuado e a análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial sugere que há redução da atividade simpática e desbalanço simpato-vagal. Concluímos que neste modelo de sepse por CLP (10 perfurações cecais) não ocorrem alterações osmóticas ou da volemia, mas, da pressão arterial e do baroreflexo. A análise espectral dos dados mostra ainda que há uma redução da atividade simpática, sugerindo que ocorre uma disfunção do sistema nervoso autônomo que poderia explicar as reduções da secreção de AVP conforme a sepse se agrava.

**Summary:** An increase in vasopressin plasma concentration (AVP) occurs in the early phase of the septic shock but this, does not persist in the late phase when there is a deficiency in the AVP secretion despite of deep hypotension. One hypothesis for this deficiency is the impairment of baroreflex that can occur already in the early phase of the septic shock. The aim of this study was to investigate the AVP plasma concentration and cardiovascular alterations during the early phase of sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP). Male Wistar rats submitted to CLP (10 puncture) or to sham operation were divided into two groups: a) group 1, had its blood pressure registered during 5 h after surgery. Subsequently, the spontaneous baroreflex sensitivity and spectral analysis of heart rate and blood pressure variability were analyzed in order to evaluate the baroreflex and autonomic nervous system integrity. b) in group 2, the animals were decapitated at 0, 2, 4, 6 and 8h after CLP surgery or sham operation and blood was collected for determination of hematocrit and plasma osmolality, as well as sodium and AVP content. There were no alterations in hematocrit, plasma osmolality and sodium in CLP and sham groups. Blood pressure, however, decreased 1 hour after CLP and remained low up to 5 hours of recording. This hypotension was followed by an increase in heart rate. The plasma AVP level increased soon after CLP reaching a peak after 4 hours and returning to basal levels at 8 h after CLP. Spontaneous baroreflex was impaired and spectral analysis of heart rate and blood pressure variability suggests that there is a reduction in sympathetic activity and a sympathovagal imbalance. We conclude that in the model of sepsis by CLP (10 puncture) there is no alterations in blood volume and osmolality, but a decrease of the blood pressure. Additionally, the baroreflex is impaired. Furthermore,

spectral analysis appointed that there was a reduction of sympathetic activity, suggesting that occurs an autonomic nervous system dysfunction that could explain the reductions of AVP secretion when the sepsis is aggravated.

**Defesa:** 20/06/2006

**Comissão:** Profa. Dra. Maria Jose Alves da Rocha – FCFRP-USP  
Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack – FCFRP-USP  
Profa. Dra. Ana Maria de Oliveira – FCFRP-USP



**Aluno:** **Juliana da Silva Oliveira**

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

**Título:** Investigação do impacto biológico da galectina-1 sobre neutrófilos

**Title:** Investigation of the biological impact of galectin-1 on neutrophils

**Resumo:** A galectina-1 pertence a uma família de proteínas que reconhecem  $\beta$ -galactosídeos e participam de vários processos biológicos, incluindo ações sobre neutrófilos como a indução da exposição de fosfatidilserina (um marcador de apoptose), a geração de espécies reativas do oxigênio (EROs) e a modulação de quimiotaxia. O neutrófilo é uma célula efetora importante da imunidade inata e sua homeostase ainda não está totalmente esclarecida. Na literatura, são relativamente escassos os dados relacionados ao impacto biológico da galectina-1 sobre os neutrófilos. Neste trabalho, foram avaliados alguns aspectos biológicos da interação galectina-1/neutrófilo, utilizando preparações de galectina-1 recombinante humana (gal-1) derivatizada ou não com iodoacetamida (CAM-Gal-1, uma forma mais estável desta lectina) e submetidas ou não a cromatografia em colunas com agarose-polimixinaB (poli-B; remoção de LPS). As suspensões de neutrófilos foram obtidas do sangue periférico de doadores sadios e submetidas ou não a procedimento de "priming" com fMLP. Através de ensaios de quimiluminescência amplificada por luminol e de citometria de fluxo (marcação com anexina-V-FITC), foi analisada uma possível correlação de positividade entre as capacidades da galectina-1 de induzir a geração de EROs e de provocar a exposição de fosfatidilserina nessas células. Neutrófilos tratados ou não com gal-1 foram submetidos a ensaio de fagocitose e de atividade microbicida utilizando *Candida albicans*. Camundongos hiporresponsivos (C3H/HeJ) e/ou responsivos ao LPS (C57Bl-6) foram utilizados em ensaio de indução de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal e nos ensaios *in vitro* de viabilidade de células da medula óssea positivas e negativas para GR1.1 (anticorpo monoclonal marcador de neutrófilos). Além disso, estes leucócitos primados ou não com fMLP foram desafiados com CAM-Gal-1/PoliB visando a quantificação da expressão de genes, em nível de RNAm, que podem apresentar caráter pró-apoptótico (CASP-3, ZAP-70 e TGF $\beta$ 1) e/ou anti-apoptótico (GAL3), através da técnica de PCR em tempo real. Nestes experimentos, as taxas de expressão de RNAm obtidas para os diferentes genes de neutrófilos não-tratados foram consideradas como referência (valor = 1). Foram obtidos 45mg/L de gal-1 purificada com alto grau de homogeneidade (banda única de 14,9 kDa). As preparações de gal-1 ou CAM-Gal-1 apresentaram a mesma capacidade hemaglutinante. As suspensões neutrofílicas mostraram pureza e viabilidade de 95 a 98%. A gal-1 foi capaz de induzir a geração de EROs apenas em neutrófilos primados com fMLP e em valores muito inferiores ao PMA. Neutrófilos primados e tratados com gal-1 apresentaram elevada porcentagem de marcação com Anexina-V-FITC, diferentemente dos não primados. O DPI, um inibidor da NADPH-oxidase, bloqueou parcialmente (31%) este efeito da gal-1 sobre neutrófilos primados, sem promover citotoxicidade. O tratamento de neutrófilo primado ou não com gal-1 não interferiu com sua ação microbicida e provocou um aumento nos valores dos índices fagocíticos dessas células. Além disso, estes valores foram reduzidos aos níveis dos neutrófilos não-tratados com gal-1 pela ação inibidora do TDG e pela inativação térmica desta lectina. A gal-1 apresentou níveis de indução de migração neutrofílica semelhante ao controle negativo quando testada em animais C3H/HeJ. Além disso, preparações de CAM-Gal-1/PoliB não foram capazes de induzir migração em animais C57Bl-6. Células da medula óssea derivadas de camundongos C3H/HeJ quando cultivadas em RPMI completo, ao contrário do cultivo com PBS, apresentaram maior viabilidade celular quando tratadas com gal-1. Células GR1.1 negativas apresentaram taxa de inibição de necrose de 95,2% e células GR1.1 positivas apresentaram taxas entre 52.4 e 73.6 %, após o desafio com essa lectina. Neutrófilos tratados com CAM-Gal-1/PoliB tiveram a expressão do mRNA do gene ZAP-70 diminuída mais em neutrófilos primados do que não primados (84 e 23%, respectivamente). Para o gene TGF $\beta$ 1, esse tratamento lectínico dos leucócitos provocou menores taxas de redução de sua expressão gênica, 36% para primados e 12% para os não primados. Entretanto, o gene da GAL3 apresentou expressão

umentada em neutrófilos tratados com CAM-Gal-1/PoliB primados ou não (392 e 319%, respectivamente). O gene da CASP-3 não apresentou variações significantes em todos os grupos experimentais. Os resultados obtidos sugerem uma correlação parcial entre a geração de EROs e a exposição de fosfatidilserina induzidas por galectina-1 em neutrófilos humanos. Entretanto, esses fenômenos parecem não conduzir os neutrófilos para o processo de apoptose, pois estes leucócitos tratados não reduziram suas atividades fagocíticas e microbicidas. Além disso, a galectina-1 foi capaz inibir, *in vitro*, a morte de células da medula óssea. Nessa linha, com base numa análise restrita e preliminar de expressão gênica, sugerimos que neutrófilos primados e tratados com gal-1 podem apresentar um direcionamento funcional para o escape da apoptose, sem o comprometimento de sua homeostase, a qual poderá ser mantida através de uma remoção de neutrófilos por fagócitos no sítio inflamatório. Finalmente, esses achados poderão auxiliar no melhor entendimento da participação da galectina-1 no processo inflamatório e na homeostase celular.

**Summary:** The galectin-1 belongs to a family of proteins that recognizes  $\beta$ -galactosides and participates of many biological processes, including neutrophil actions like the induction of phosphatidylserine exposure (an apoptosis marker), production of intermediary reactive oxygen species (IROs) and the chemotaxis modulation. The neutrophil is a important effectors cell of the innate immunity and its homeostasis is not completely known. In the literature the data related to the biological impact of galectin-1 on neutrophils are few. In this work some biological aspects of the galectin-1-Neutrophil interaction were investigated, using human recombinant galectin-1 (gal-1) preparations derivative or not with iodoacetamide (CAM-Gal-1, a stable form of this lectin). These lectin preparations were submitted or not to the chromatography on the agarose-polymixim B (PolyB- to remove LPS). The neutrophil suspensions were obtained from healthy donators and were submitted or not to a priming procedure with fMLP. The NADPH-oxidase activity was measured a luminol amplified chemiluminescence. The level of phosphatidylserine exposure on cell surface was assessed by annexinV-FITC staining using a flow cytometer. Neutrophils treated or not with gal-1 were submitted to phagocytosis and intracellular killing of *C. albicans in vitro* assays. LPS-hypo-responsive mice (C3H/HeJ) and/or LPS-responsive mice (C57Bl/6) were used to assessed the ability of gal-1 to induces *in vivo* neutrophil migration. Also, the mice C3H/HeJ were used on the viability *in vitro* assays of the bone marrow cells positive and negative to GR1.1 (neutrophil marker antibody). In addition, neutrophil and primed neutrophils were challenged with CAM-Gal-1/PoliB to analyze the gene expression of pro-apoptotic genes (CASP3, ZAP-70 and TGF $\beta$ 1) and/or anti-apoptotic gene (GAL3), by Real Time-PCR. On these experiments, the mRNA expression levels obtained for the different genes of no-treated neutrophils were used as reference (value=1). SDS-PAGE analysis of gal-1 preparations ( $\approx$  45mg/L) demonstrated that protein samples was apparently homogeneous and migrated with a molecular mass  $\approx$  14,9 kDa. The gal-1 and CAM-Gal-1 preparations presented the same hemagglutination activity. The neutrophil suspension showed purity and viability of 95 to 98%. The gal-1 was able to induce a generation of IROS only in neutrophils primed with fMLP and in alive to much lower to PMA. Primed neutrophil presented elevated percentage of staining with Annexin-V-FITC, differently of the no primed cells. The DPI, one NADPH-oxidase inhibitor, promoted a partially blocked (31%) of this gal-1 effect on primed neutrophils without promote cytotoxicity. The treatment of neutrophil with gal-1 did not interfere with its intracellular killing of *C.albicans* and enhanced the phagocytic level of these cells. The enhancer of neutrophil phagocytosis promotes by gal-1 was inhibited by TDG or by heating of this protein. The gal-1 induces the neutrophils migration as the negative control level when its tested in C3H/HeJ mice. Beyond this, CAM-Gal-1/PoliB was not capable to induce neutrophil migration to the peritoneal cavity of C57Bl/6 mice. Interesting, the bone marrow cells, derived from C3H/HeJ mice when incubated with complete RPMI plus gal-1, in contrast to PBS incubation, shown more cell viability. Negative GR1.1 from bone marrow cells presented inhibition levels of necrosis (95.2%) and positive GR1.1 cells presented levels between 52.4% and 73,6%, after the treatment with this lectin. CAM-Gal-1/PoliB treated neutrophils had the mRNA expression of the ZAP-70 gene high decreased in primed neutrophils than in no-primed neutrophils (85% and 23%, respectively). To the TGF $\beta$ 1 gene, this leukocyte lectin treatment promoted lower reduction levels on its expression, 36% to primed and 12% to non-primed neutrophils. However, the GAL3 gene presented increased expression on CAM-Gal-1/POLYB treated neutrophil primed or not (392% and 319%,

respectively). The CASP 3 gene did not present significant variations on all experimental groups. Taken together, these results suggest that a partial connection between IROS generation and the phosphatidylserine exposure induced by galectin-1 on human neutrophils. However, these biological actions seem not to be promotes the neutrophil apoptosis because the treated leukocytes did not reduce their phagocytic and fungicidal activities. Beyond this, the gal-1 was capable to inhibit, *in vitro*, the bone marrow cells death. In these thoughts, with basis on one restricted analysis and preliminary gene expression, we suggest that primed neutrophils and treated with gal-1 can present a functional direction to the apoptosis escape without compromise of its homeostasis. Because the neutrophil remove can be maintained by phagocytes on the inflammatory site. Finally, these findings can help in the better understanding of the galectin-1 participation in the inflammatory process and in cellular homeostasis.

**Defesa:** 19/07/2006

**Comissão:** Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi - FCFRP-USP  
Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim - FCFRP-USP  
Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado - UNIARA

**Aluno:** Karen Regina Carim da Costa

**Orientador:** Profa. Dra. Regina Celia Candido

**Título:** Isolamento, quantificação, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras da saliva de pacientes imunocompetentes portadores de lesão bucal

**Title:** Isolation, quantification, enzymatic activity and antifungal susceptibility of yeasts from whole saliva of non-compromised patients with clinical signs of candidiasis

**Resumo:** A candidíase é a mais freqüente infecção fúngica oportunista, causada por leveduras do gênero *Candida*, de ocorrência comum na cavidade bucal. O aumento da incidência está relacionado, em grande parte, ao surgimento das terapias e patologias imunossupressoras, embora ela possa ocorrer em indivíduos considerados saudáveis. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a microbiota leveduriforme de pacientes com lesão bucal suspeita de candidíase e compará-la com a de indivíduos saudáveis através da quantificação, produção de enzimas fosfolipase, proteinase e determinação da CIM dos antifúngicos: anfotericina B, itraconazol e fluconazol pelo método de microdiluição em caldo. As leveduras foram isoladas a partir de amostras de saliva não estimulada no meio CHROMagar® *Candida*, que permitiu a observação de colonização mista e uma identificação presuntiva. Posteriormente os isolados foram identificados pela metodologia clássica, através das provas: formação de tubo germinativo em soro humano, estudo da micromorfologia, crescimento a 37°C e 42°C, provas de assimilação e fermentação de carboidratos. Das 100 amostras de saliva dos pacientes com lesão, 70 apresentaram crescimento de leveduras e foram identificadas 63 *C. albicans* e 16 *C. tropicalis*. Entre as 50 amostras de salivas do grupo controle, 16 apresentaram crescimento e foram identificadas 14 *C. albicans* e 3 *C. tropicalis*. Quanto à capacidade de síntese das exoenzimas observou-se que 100% das *C. albicans* de ambos os grupos avaliados produziram as enzimas fosfolipase e proteinase em diferentes níveis de atividade. Os isolados de *C. tropicalis* não apresentaram produção da fosfolipase, com relação à proteinase 43,8% dos isolados de pacientes com lesão bucal foram positivos. Em relação aos testes de sensibilidade, a faixa da CIM para anfotericina B foi de 0,125 – 4µg/mL para os isolados de *C. albicans* e de 2 – 4 µg/mL para os de *C. tropicalis*, com o itraconazol o intervalo da CIM foi de 0,03 – 16µg/mL para as duas espécies e para o fluconazol a faixa da CIM foi de 0,125 - ≥64µg/mL para os isolados de *C. albicans* e de 0,25 - ≥64µg/mL para os de *C. tropicalis*. Com base nos resultados obtidos conclui-se que: a análise de saliva é sensível para detecção de leveduras tanto em pacientes com sinais clínicos de candidíase quanto em indivíduos saudáveis portadores da levedura; *C. albicans* foi à espécie mais isolada em ambos os grupos; todas os isolados de *C. albicans* foram produtores das enzimas fosfolipase e proteinase; nenhum isolado de *C. tropicalis* apresentou atividade da enzima fosfolipase. A maioria dos isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* foram sensíveis *in vitro* aos antifúngicos testados.

**Summary:** Candidiasis is the most frequent opportunistic fungal infection. It is caused by *Candida* yeasts, commonly seen in the oral cavity. Newer therapies and immunosuppressive pathologies are related to the increase of oral candidiasis incidence, although it may occur in healthy subjects. Therefore, the aim of this work was to evaluate yeasts frequency in the oral cavity from patients with clinical signs of oral candidiasis and compare it with frequency observed in healthy subjects through quantification, phospholipase and proteinase activity tests and antifungal susceptibility (amphotericin B, itraconazole, fluconazole) by broth microdilution test. The yeasts were isolated from unstimulated whole saliva samples in CHROMagar® *Candida* medium, which allowed association between two or more species observation and presumptive identification. Latter, strains identification were confirmed by classical methodology. Of 100 candidiasis patients samples, yeast growth was observed in 70 samples and 63 *C. albicans* and 16 *C. tropicalis* strains were identified. Of 50 healthy subjects samples, yeast growth was observed in 16 samples and 14 *C. albicans* e 3 *C. tropicalis* strains were identified. Differential activity of phospholipase and proteinase enzymes was detected in 100% *C. albicans* strains in both groups. Phospholipase activity was not detected in *C. tropicalis* strains, and proteinase activity was detected in 43,8%

strains from oral candidiasis group. Susceptibility tests showed amphotericin B MIC range from 0,125 – 4 µg/mL for *C. albicans* strains and 2 – 4 µg/mL for *C. tropicalis* strains; itraconazole MIC range from 0,03 – 16 µg/mL for both species; fluconazole MIC range from 0,125 - ≥ 64 µg/mL for *C. albicans* strains and 0,25 - ≥ 64 µg/mL for *C. tropicalis* strains. In conclusion, our study demonstrates that saliva analysis is sensitive to detect yeasts from patients with clinical signs of oral candidiasis and from yeasts carriers; *C. albicans* was prevalent in both groups; all *C. albicans* strains showed phospholipase and proteinase activity; None *C. tropicalis* strains showed phospholipase activity. The majority of *C. albicans* and *C. tropicalis* strains were inhibited *in vitro* by antifungals evaluated.

**Defesa:** 31/07/2006

**Comissão:** Profa. Dra. Regina Celia Candido - FCFRP-USP  
Profa. Dra. Marilena Chinali Komesu - FORP-USP  
Profa. Dra. Claudia Maria Leite Maffei - FMRP-USP

**Aluno:** Pollyana Barbosa Farias Corrêa

**Orientador:** Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha

**Título:** Estudo da participação do NO (óxido nítrico) na secreção temporal de vasopressina durante choque séptico experimental induzido por ligadura e perfuração cecal

**Title:** Study of the participation of NO (nitric oxide) in the secretion of vasopressin time during experimental septic shock induced by cecal ligation and perforation

**Resumo:** O choque séptico caracteriza-se por infecção sistêmica acompanhada de hipotensão não responsiva a vasoconstritores. Nas fases iniciais há um aumento acentuado na secreção de vasopressina (AVP) que se reduz nas fases mais avançadas do choque séptico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação da via sistêmica da óxido nítrico sintase induzida (NOSi) na ativação hipotalâmica e na secreção temporal de AVP durante choque séptico experimental. Como modelo de sepse, utilizamos a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) em ratos e, como inibidor de NOSi, utilizamos a aminoguanidina (AG). Em 24 horas o CLP promoveu cerca de 80% de mortalidade, com o pré-tratamento com AG, essa porcentagem chegou a 50%. Foi observado também um aumento progressivo na ingestão hídrica que não foi alterado pela administração prévia de AG. Os animais sépticos tiveram um extravasamento de proteínas plasmáticas a partir de 6 horas e a AG conseguiu reverter esse efeito em 24 horas. Além disso, o CLP promoveu uma queda progressiva na pressão arterial média pelo tempo analisado de 6 horas e a AG reverteu esse quadro. A análise da expressão de c-fos nos núcleos paraventricular (PVN), supraóptico (SON) e no Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVL) após CLP revelou aumento 6 horas após o estímulo que foi reduzido pela injeção prévia de AG. Após 24 horas, a expressão de c-fos voltou aos níveis basais em todos os núcleos estudados e a AG previamente injetada conseguiu reverter parcialmente esse efeito no SON e OVL, mas não no PVN. Em 6 horas, houve um aumento nas concentrações plasmáticas de AVP que retornaram aos valores basais em 24 horas. A AG reduziu o pico de secreção de AVP em 6 horas e não alterou as concentrações desse hormônio após 24 horas do CLP. Os resultados sugerem que nas fases iniciais da sepse ocorrem alterações hemodinâmicas e hidroeletrólíticas capazes de induzir ativação hipotalâmica e aumento nas concentrações plasmáticas de AVP e que são reduzidas pelo tratamento prévio com inibidor de NOSi. Entretanto, nas fases finais, a inibição sistêmica observada não foi suficiente para alterar as concentrações plasmáticas desse hormônio.

**Summary:** Septic shock is a systemic infection accompanied by hypotension that is not responsive to vasoconstrictors. In the early phase there is an increase in vasopressin (AVP) secretion that is reduced in the late phase. The aim of this study was to evaluate the participation of nitric oxide synthase inducible (iNOS) in hypothalamic activation and in the time-course of AVP secretion during experimental septic shock. The septic model utilized was a cecal ligation and puncture surgery (CLP) in rats. The iNOS inhibitor utilized was aminoguanidine (AG). CLP caused 80% mortality in experimental animals. AG pre-treatment reduced this percentage to 50%. We observed a progressive increase in drinking behavior that was not affected by a previous AG administration. Septic animals had plasma protein leakage beginning at 6 hours and AG reversed this effect in 24 hours. Moreover, CLP promoted a progressive decrease on arterial blood pressure during the time analyzed (6 hours) which AG reduced. The analysis of c-fos expression in paraventricular (PVN), supraoptic (SON) and Organum Vasculosum of Lamina Terminalis (OVL) nuclei showed an increase 6 hours after surgery that was reduced by previous AG injection. At 24 hours, c-fos expression was reduced to basal values in all nuclei studied and AG pre-treatment partially reversed it in SON and OVL nuclei, unless in PVN. At 6 hours, CLP promoted an increase in plasma AVP concentration that returned to basal values at 24 hours. AG pre-treatment reduced the AVP secretion peak at 6 hours but did not change the hormone concentration at 24 hours after CLP. The results suggest that in the early phase of sepsis there are hemodynamic and hydroelectrolytics changes that can induce hypothalamic activation resulting in high AVP plasma levels. These changes are attenuated by iNOS inhibitor pre-treatment. However, in the late phase, the systemic inhibition observed appears insufficient to change AVP plasma

concentrations.

**Defesa:** 20/01/2006

**Comissão:** Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha - FORP – USP  
Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio - EERP - USP  
Prof. Dr. Auro Nomizo - FCFRP – USP



**Aluno:** Regiane Priscila Ratti

**Orientador:** Elaine Cristina Pereira de Martinis

**Título:** *Listeria monocytogenes* em alimentos fatiados e equipamentos : ocorrência, formação do biofilme e sanitização

**Title:** *Listeria monocytogenes* in sliced foods and food processing equipments: occurrence biofilm formation and sanitization.

**Resumo:** *Listeria monocytogenes* é o agente causal da listeriose, uma doença que pode atingir mulheres grávidas (e seus fetos), crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico comprometido, A listeriose representa a maioria dos casos de morte decorrente de toxinfecções alimentares. Os alimentos são reconhecidos como fontes primárias da transmissão desta bactéria para o homem e *L. monocytogenes* já foi isolada de uma grande variedade de alimentos. Superfícies de equipamentos utilizados na produção de alimentos também podem estar contaminadas com este patógeno. Falhas em procedimentos de higienização podem deixar resíduos nos equipamentos de processamento de alimentos e *L. monocytogenes* pode se aderir a superfícies abióticas e iniciar sua multiplicação, dando origem a biofilmes. A interação com bactérias de outras espécies pode influenciar na forma formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, constituindo um aspecto importante de estudo para auxiliar no controle da contaminação de alimentos por esta bactéria. *Leuconostoc mesenteroides* é uma bactéria láctica normalmente encontrada em alimentos e algumas cepas podem interferir na multiplicação de *L. monocytogenes* pela produção de bacteriocinas com atividade antilisterial. Os biofilmes representam uma preocupação para indústria de alimentos, pois geralmente os microorganismos aderidos apresentam maior capacidade de resistir a tratamentos antimicrobianos. Neste trabalho, foram coletadas 30 amostras de presunto cozido fatiado, 30 de mussarela fatiada e 30 de superfícies de equipamentos de fatiar alimentos, em estabelecimentos do comércio varejista de Ribeirão Preto – SP. As amostras foram avaliadas quanto à presença ou ausência de *L. monocytogenes* e também foi estudada a capacidade dos isolados em formar biofilmes em cultura pura e em testes de co-cultura. O sanitizante ácido peracético e a bacteriocina nisina foram testados para controlar a formação de biofilme por *L. monocytogenes*. Os resultados obtidos mostram que os isolados de *L. monocytogenes* formaram biofilme em superfície de aço inoxidável quando cultivados isoladamente ou em testes de co-cultura com *L. mesenteroides*. O tratamento da lâmina com ácido peracético inativou todas as células presentes no biofilme. Nas condições utilizadas, nisina não apresentou atividade contra *L. monocytogenes* em biofilmes.

**Summary:** *Listeria monocytogenes* is the causal agent of listeriosis, an infection that targets mainly pregnant women (and their fetuses), children, the elderly and immunocompromised individuals. Listeriosis represents the majority of fatal cases of foodborne diseases. Foods are recognized as primary sources of transmission of this bacterium to man and *L. monocytogenes* has been isolated from of a great variety of foods. Surfaces of equipments used in the production of foods can harbour *L. monocytogenes*. Failures in sanitization procedures can leave food residues adhered to equipments of food processing and *L. monocytogenes* can attach to abiotic surfaces, multiply and form biofilms. Interactions among bacteria of diverse species may influence biofilm formation by *L. monocytogenes* and this is an important issue to be studied to improve food safety. *Leuconostoc mesenteroides* is a lactic bacterium usually found in foods and some strains can interfere with the multiplication of *L. monocytogenes* by production of bacteriocins with antilisterial activity. Biofilms represent a special concern to the food industry, because adhered microorganism are generally more resistant to antimicrobial treatments. In this work, we collected 30 samples of sliced cooked ham, 30 of sliced mozzarella cheese and 30 of surfaces of food processing equipments, in the retail market of the city of Ribeirão Preto - SP. The samples were studied for presence or absence of *L. monocytogenes*. The ability of the isolates to form biofilms was also studied, in pure and in co-culture tests. The sanitizer peracetic acid and the bacteriocin nisin were tested to control biofilm formation by *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* formed biofilm on

stainless steel coupons when cultivated alone or in co-culture with *L. mesenteroides*. The treatment of stainless steel coupons with peracetic acid inactivated the cells of the biofilm. Under the experimental conditions tested nisin did not present activity against *L. monocytogenes* in biofilms.

**Defesa:** 03/07/2006

**Comissão:** Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis – FCFRP-USP  
Profa. Dra. Maria Jose Vieira Fonseca - FCFRP-USP  
Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad - FCFRP-USP

**Aluno:** Rosane Maria Falasco Bolzoni

**Orientador:** Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli

**Título:** Avaliação do Papel dos Leucotrienos na Candidíase Murina

**Title:** Evaluation of the Role of Leucotrienos in candidiasis Murina

**Resumo:** *Candida albicans* é o agente etiológico da candidíase, a qual pode ser uma infecção local ou sistêmica. Nesta micose, a resposta Th1 com produção de IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$ , está associada com ativação de macrófagos e resistência à reinfecção. A resposta Th2, com liberação de IL-4, IL-6 e IL-10, leva à exacerbação da doença. Neutrófilos e macrófagos são consideradas as principais células efetoras na candidíase. Os leucotrienos são importantes mediadores da resposta imune protetora em diferentes processos infecciosos. O presente estudo teve como objetivo investigar a importância dos leucotrienos na candidíase. Para isso, camundongos deficientes de leucotrienos (5-LO KO) e selvagens (129), foram infectados i.v., e 1, 3, 7 e 14 dias após, determinamos (1) os números de leucócitos sanguíneos e de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos rins, baços e fígados, (2) as alterações histopatológicas, o número de neutrófilos, macrófagos, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e citocinas nos rins, (3) em cultura de células de baço, a produção de NO e IL-12. Além disso, avaliamos *in vitro* o efeito da infecção (1) de células dos rins e baço, e a (2) atividade microbida de macrófagos. Nossos resultados mostraram que há aumento relativo de neutrófilos no sangue periférico de animais 5-LO KO, 1 dia após a infecção, fato que foi acompanhado por diminuição do número de células mononucleares, em comparação aos controles. Aumento no número absoluto de neutrófilos só foi observado em animais 129 no 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias após infecção. A ausência de leucotrienos resultou na eliminação mais rápida de *C. albicans* dos rins de animais 5-LO KO, quando comparamos com os 129. Os achados histopatológicos confirmam estes dados. Animais 5-LO KO e 129 infectados apresentaram igualmente aumento de neutrófilos nos rins no 3<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dias após a infecção, em relação aos respectivos controles. No entanto, aumento de linfócitos TCD4<sup>+</sup> só foi observado no 7<sup>o</sup> dia após infecção, nos animais 129. Não houve diferença quanto ao número de macrófagos e linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos dois dias analisados em ambas as linhagens. Em relação às citocinas presentes no sobrenadante de rins, somente animais 5-LO KO infectados apresentaram aumento de IL-1, no 3<sup>o</sup> dia após infecção, quando comparado com animais 129 infectados, ou seus controles. Por outro lado, rins de ambas as linhagens apresentaram aumento de KC em todos os dias analisados, embora naqueles 5-LO KO houve diminuição significativa no 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias quando comparado com os selvagens. Não foram observadas diferenças quanto aos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4 nos períodos analisados. Em sobrenadante de cultura de baço, houve aumento significativo de IL-12 somente por células obtidas 7 e 14 dias, e de NO somente por células coletadas de animais 129, no 1<sup>o</sup> dia após infecção. Nos experimentos de infecção de células de rins e baço *in vitro*, na presença ou ausência de leucotrieno exógeno, observamos menor número de UFC em células de rins e baço de animais 5-LO KO. A adição de leucotrieno exógeno reverteu este fenômeno somente em células de rins. Além disso, macrófagos peritoneais de animais 5-LO KO matam mais *C. albicans* do que células de camundongos 129, quando estas foram opsonizadas com anticorpo e complemento. Por outro lado, macrófagos peritoneais de animais 129 tiveram atividade microbida maior que os de 5-LO KO, quando a *C.albicans* foi pré incubada somente com meio de cultura.

**Summary:** *Candida albicans* is the causative agent of candidiasis, which can be a local or systemic infection. In this mycosis, the Th1 response with production of IL-2, IL-12, IFN- $\alpha$  and TNF- $\gamma$  is associated with activation of macrophages and resistance to reinfection. The Th2 response, with release of IL-4, IL-6 and IL-10, leads to the exacerbation of the disease. Neutrophils and macrophages are considered the main effector cells in candidiasis. The leukotrienes are important mediators of the protective immune response in different infectious processes. This study aimed to investigate the importance of leukotrienes in candidiasis. For this, mice deficient of leukotrienes (5-LO KO) and wild (129), were infected i.v., and 1, 3, 7 and 14 days

later, we determine (1) the numbers of leukocytes and blood forming units of Cologne (CFU) in the kidneys, livers and spleens, (2) the histopathological changes, the number of neutrophils, macrophages, lymphocytes CD4 + and CD8 + and cytokines in the kidneys, (3) in culture of cells from spleen, the production of ON and IL-12. Also, in vitro evaluate the effect of infection (1) of cells of kidneys and spleen, and (2) microbicide activity of macrophages. Our results show that there is relative increase of neutrophils in the peripheral blood of animals 5-LO KO, 1 day after infection, a fact that was accompanied by reduction in the number of mononuclear cells, compared to the controls. Increase in the absolute number of neutrophils was observed in only 129 animals in the 7th and 14th days after infection. The absence of leukotrienes resulted in more rapid elimination of *C. albicans* the kidneys of animals KO 5-LO, when compared with the 129. The histopathologic findings confirm these figures. Animals 5-LO KO infected and 129 have also increased in the kidneys of neutrophils in the 3rd and 7th day after infection, for the respective controls. However, increase in CD4 + T cell count was only observed in the 7th day after infection, animals 129. There was no difference in the number of macrophages and CD8 + T lymphocytes in two days analysed in both lines. For cytokines in the supernatant of kidneys, only 5-LO KO animals infected showed an increase of IL-1, the 3rd day after infection, compared with 129 infected animals, or their controls. On the other hand, kidneys of both lines had increased by KC on all days tested, although those 5-LO KO there was a significant decrease in the 7th and 14th days when compared to the wild. There were no differences, IL-10 and IL-4 in the periods examined.  $\alpha$ , TNF- $\gamma$  in the levels of IFN- In the supernatant culture of spleen, there was significant increase of IL-12 cells obtained only by 7 and 14 days, and NO only by cells collected from animals 129, in the 1st days after infection. In the experiments of infection of the kidneys and spleen cells in vitro, in the presence or absence of leukotriene exogenous, we observed fewer CFU in cells of kidneys and spleen of animals 5-LO KO. The addition of exogenous leukotriene reversed this phenomenon only in cells of kidneys. Also, peritoneal macrophages of animals 5-LO KO kill more *C. albicans* than cells from mice 129, when they were opsonizadas with antibody and complement. On the other hand, peritoneal macrophages of 129 animals had increased activity microbicide that of 5-LO KO, when the pre *C. albicans* was incubated only with the culture.

**Defesa:** 08/03/2006

**Comissão:** Profa. Dra. Lucia Helena Faccioli – FCFRP-USP  
Profa. Dra. Claudia Maria Leite Maffei - FMRP-USP  
Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi – FCFRP-USP

**Aluno:** Viviane Rodrigues Esperandim

**Orientador:** Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

**Título:** Caracterização biológica de uma população de *Trypanosoma cruzi* isolada na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Campus Universitário da Universidade de São Paulo

**Title:** Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strain isolated in Ribeirão Preto, São Paulo, University of São Paulo

**Resumo:** Muitos estudos mostram que o comportamento biológico das amostras de *Trypanosoma cruzi* pode estar relacionado com a composição morfológica dos tripomastigotas sangüícolas. As cepas do parasita, isoladas de diferentes tipos de hospedeiro, apresentam alta variabilidade genética, tropismo tecidual diferenciado e desencadeiam quadros clínicos variáveis, segundo características próprias do hospedeiro e das populações infectantes. Assim, na tentativa de correlacionar as variações inerentes às distintas cepas de *Trypanosoma cruzi*, é objetivo do presente trabalho avaliar o comportamento e as diferenças biológicas existentes em uma população do parasita, isolada na cidade de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. Como critérios de estudo, adotamos a caracterização morfológica, molecular e ensaios de sensibilidade ao benzonidazol e à violeta-de-genciana desta cepa, denominada CG. Esta cepa foi submetida a análises morfométricas, sendo observadas variações entre valores máximo e mínimo, principalmente aos valores relacionados ao volume nuclear e outros como largura e comprimento total do corpo. Com relação à análise morfológica pode-se observar o predomínio de formas tripomastigotas intermediárias, sendo observado também a presença de numerosas formas com características delgadas e largas. Ainda observamos que o pico parasitêmico para o grupo de *C. callosus* foi atingido no 19º dia, enquanto que para o grupo de camundongos *M. musculus* a curva parasitêmica apresentou picos parasitêmicos nos 24º e 29º dias. Verificou-se também que, quanto à sensibilidade ao benzonidazol, as formas epimastigotas mostraram-se resistentes e as formas tripomastigotas sanguíneas sensíveis a esta substância. Com relação à violeta-de-genciana constatou-se uma alta eficácia para as formas tripomastigotas sanguíneas. Esta cepa foi infectante para 100% dos triatomíneos utilizados, sendo que a espécie *Triatoma infestans* demonstrou maior susceptibilidade. A análise da caracterização molecular mostrou um produto de amplificação por PCR do minixon de *Trypanosoma cruzi* de 350pb, que equivale a linhagem 2.

**Summary:** Several studies describe that the biological behavior of the *Trypanosoma cruzi* populations can be related with the morphological composition of the blood trypomastigotes. Parasite strains isolated from distinct hosts, display high genetic variability, individual tecidual tropism which trigger different clinical aspects, depending on the wide range of the host's characteristic and those from infective populations. In the attempt to correlate the individual variations of the different *T. cruzi* strains, this study has as main goals to evaluate the behavior and the biologic differences within a certain parasite population. For that, male *Mus musculus* and *Calomys callosus* were i.p. infected with  $2 \times 10^4$  blood trypomastigotes of the CG strain isolate from a triatomine found in district of Ribeirão Preto, São Paulo state. The parameters evaluated in this experiment were: morphological and molecular characterization, and benzonidazol and gencian violet sensitivity assays. The morph metric analysis revealed variations concerning to the highest and lowest values for nuclear volume, width and total body length. Morphologically it was observed a predominance of intermediate forms, but also the co-existence of slender and broad ones. Parasitemia peak was distinct for both experimental models. *C. callosus* revealed the highest parasite levels on 14<sup>th</sup>. after infection, while *M. musculus* reached parasitemia peak around 24 to 29<sup>th</sup> day. Concerning to the drug sensitivity test, epimastigote forms displayed resistance to benzonidazole, while blood trypomastigotes were destroyed. The highest lysis percentage over the blood trypomastigote forms was achieved by the use of gencian violet. Concerning to the capacity to induce infection, all triatomines were infected displaying metacyclic trypomastigotes after the required time of evolution inside the vector. The enhanced susceptibility to infection was observed for *Triatoma infestans*. Molecular characterization by PCR using *T. cruzi* mini-exon

revealed a band of 350pb wich is linked with the lineage 2

**Defesa:** 28/4/2006

**Comissão:** Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque - FCFRP-USP  
Prof. Dr. Gutemberg de Melo Rocha - FMRP-USP  
Profa. Dra. Ana Amélia Carraro Abrahão - FCFRP-USP