



## MESTRADO – 2008

**Aluno:** Anna Carolina de Freitas Policarpo

**Orientador:** Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

**Defesa:** 08/05/2008

**Título:** Vias alternativas mitocondriais: clonagem e caracterização bioquímica do gene da NADH desidrogenase alternativa de *A. fumigatus*

**Title:** Alternative mitochondrial pathways: cloning and biochemical characterization of the *A. fumigatus* alternative NADH dehydrogenase gene.

**Resumo:** *Aspergillus fumigatus* é um fungo filamentosos e saprofítico encontrado em todas as regiões do mundo. A principal forma de infecção ocorre através da inalação de conídios do fungo com predominância de infecções no trato respiratório, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Foi caracterizada a função mitocondrial de *A. fumigatus* e sugeriu-se a presença de vias alternativas, dentre elas, a presença da NADH desidrogenase alternativa. A fim de colaborar com estudos para elucidação do papel desta enzima, foi realizada a clonagem dos genes das NADH desidrogenase alternativa interna e externa de *A. fumigatus*. A análise da seqüência de aminoácidos revelou um perfil de hidropaticidade com a presença de quatro regiões hidrofóbicas, semelhante às outras seqüências já descritas. Além disso, foram identificados dois motivos (GXGXXG) altamente conservados para ligações a nucleotídeos, dentro de um domínio  $\beta\alpha\beta$  os quais estão relacionados com a estrutura e atividade da enzima. A seqüência de cDNA do gene *ndhiAf* foi clonada em plasmídeo pYES2 e expressa em *S. cerevisiae* cepa CEN.PK873-2B; a expressão da NDHIAf foi verificada por técnica de Western-blot. A proteína foi expressa de forma ativa, conferindo à levedura uma respiração e a formação de um potencial de membrana resultantes da oxidação de substratos clássicos do complexo I, sugerindo sua localização na membrana mitocondrial interna. Além disso, as cepas expressando essa proteína foram capazes de crescer em meio contendo apenas lactato como fonte de carbono, uma característica atribuída à presença da NADH desidrogenase alternativa interna (NDHi). Considerando que a atividade das NDHIAf e NDHEAf estão sob controle metabólico, nos avaliamos o efeito de diferentes concentrações de glucose como única fonte de carbono no meio de cultura. Durante a germinação conidial, não foi observada expressão da NDHIAf e NDHEAf na presença de baixas concentrações de glucose. Entretanto, durante a fase de hifas foi observado um aumento na expressão de NDHIAf e NDHEAf. Por outro lado, em alta concentrações de glucose, durante a germinação conidial, foi observado expressão da NDHIAf mas nenhuma expressão da NDHEAf. Na fase de hifas observou-se um aumento da expressão da NDHIAf e uma diminuição da NDHEAf

**Summary:** *Aspergillus fumigatus* is a filamentous and saprophytic fungus found in all regions of the world. The main form of infection occurs through inhalation of fungi conidial, with predominance of infections in the respiratory treat, mainly in immunocompromised host. It was characterized the mitochondrial function of *A. fumigatus* and suggested the presence of alternative pathways, including the alternative NADH dehydrogenase. In order to elucidate its role, genes of the external and internal enzymes were cloned. Analysis of the amino acid sequence and hydropathy plot revealed a profile with four hydrophobic regions, similar to other already described sequences. Moreover, two highly conserved motifs (GXGXXG) for the nucleotides interaction, related with the structure and activity of the enzyme, were identified inside the *\_a\_* domain. The sequence of DNA of the *ndhiAf* gene was cloned in an expression plasmid pYES2 and expressed in CEN.PK873-2B *S. cerevisiae* strain; the

expression was confirmed by Western-blot analysis. The protein was expressed in an active form, providing to the yeast an oxygen consumption and a potential membrane formation due to oxidation of the complex I substrate, suggesting its localization in the inner mitochondrial membrane. Moreover, strains expressing this protein were capable of growing in medium with only lactate as a carbon source, a characteristic associated with the presence of internal alternative NADH dehydrogenase (NDHI). Considering that NDHI and NDHE activities are under metabolic control, we evaluated the effect of different concentrations of glucose as the only carbon source in the medium of culture. During conidia germination, it was not observed neither an expression of NDHI nor NDHE in the presence of low concentrations of glucose. However, in hyphae phase was observed an increase an expression of NDHI and NDHE. On the other hand, in high concentration of glucose, during conidia germination was observed an expression of NDHI and not expression of NDHE. In hyphae phase was observed a decrease an expression of NDHI and an increase of NDHE.

**Comissão:** Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura  
Prof. Dra. Nadia Monesi  
Prof. Dr. Roger Figueiredo Castilho

**Aluno:** **Fernanda Carregaro**

**Orientador:** Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino

**Defesa:** 10/04/2008

**Título:** Estudo de polimorfismos genéticos na susceptibilidade e na resposta à sepse

**Title:** Study of genetic polymorphisms in the susceptibility and in the response to sepsis

**Resumo:** Polimorfismos em genes codificando proteínas envolvidas no reconhecimento de microrganismos e na resposta imune contra patógenos podem influenciar na quantidade ou na função da proteína produzida em resposta ao estímulo bacteriano. Existem evidências de que alguns destes polimorfismos genéticos modificam a resposta do paciente à sepse. No presente estudo, foram estudados polimorfismos presentes em genes que, sabidamente ou supostamente, apresentam um efeito biológico importante na sepse com o objetivo de identificar marcadores associados com a sepse e com a evolução clínica favorável ou com a morte. Entre esses polimorfismos estão aqueles presentes nos genes TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL1RN, HSP70, IL6, IL10, CD14, TLR4, TLR2. As técnicas utilizadas compreenderam PCR em tempo real usando sondas com marcação fluorescente (VIC e FAM), PCR usual, digestão com enzimas de restrição e eletroforese. Os 97 pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico estudados foram tratados na UTI do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Também foram estudadas amostras de 207 indivíduos saudáveis coletadas no Hemocentro do mesmo hospital. Os polimorfismos IL6-597, HSP70-2 e o haplótipo do gene IL6 apresentaram valores estatisticamente significativos. Os dados obtidos sugerem que os polimorfismos IL6-597 e o haplótipo IL6 -174/-1753/-2954/-597 estão associados com a evolução clínica da sepse, enquanto o polimorfismo do gene HSP70 está associado com bacteremia. A associação de polimorfismos em pacientes com sepse deverá ser avaliada em um maior número de pacientes no Brasil para ampliar nosso conhecimento sobre variantes genéticas e seus efeitos no curso clínico da sepse. Associações de polimorfismos com sepse e susceptibilidade a infecção podem ser no futuro utilizadas como marcadores moleculares para prognóstico

**Summary:** Polymorphisms in genes codifying proteins involved in the recognition of microorganisms and in the answer of pathogens can influence the amount or the function of the protein produced in response to bacterial incentive. There are evidences that some of these genetic polymorphisms modify the patient's answer to sepsis. In the present study, we studied polymorphisms present in genes that, knowingly or supposedly, has an important biological effect in sepsis with the objective of identifying markers associated with sepsis and with the favorable clinical evolution or with the death. Among those polymorphisms they are those presents in the genes TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , IL1RN, HSP70, IL6, IL10, CD14, TLR4, TLR2. The used techniques were Real time PCR using fluorescent probes (VIC and FAM), PCR, digestion with restriction enzymes and electrophoresis. The 97 patients with sepsis, severe sepsis and septic shock studied were those treated in INTENSIVE CARE UNIT of the Base's Hospital of Sao Jose do Rio Preto. And 207 healthy individuals' samples were collected in Hemocentro of the same hospital. The polymorphisms of the genes IL6-597, HSP70-2 and the haplotype of the gene IL6 presented estatistical significant values. The polymorphism IL6-597 and the haplotype IL6 - 174/-1753/-2954/-597 can be associated with the clinical evolution of sepsis, while the polymorphism of the gene HSP 70 can be associated with bacteremia. The association of polymorphisms in patients with sepsis will have to be evaluated in bigger samples of patients in Brazil to extend our knowledge on genetic variants and

---

its effect in the clinical course of sepsis. Associations of polymorphisms with sepsis and susceptibility to infection can be in the future used as molecular marker for prognostic

**Comissão:** Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino  
Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini  
Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

**Aluno:** Gabriela Braga Rodrigues

**Orientador:** Prof.Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

**Defesa:** 29/08/2008

**Título:** Avaliações das atividades fotossensibilizadoras do azul de metileno, da cloro-alumínio ftalocianina e do nitrosilo de rutênio no fungo *Cryptococcus neoformans*

**Title:** Estimate of the photosensitizing activities of the methylene blue, chloroaluminum phthalocyanine and nitrosyl ruthenium complex in the fungus *Cryptococcus neoformans*.

**Resumo:** O basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* é um fungo saprófita, com ampla distribuição geográfica, que é normalmente isolado de solos que contêm excretas de pombos e detritos vegetais. Apesar de saprófita, o fungo pode infectar e causar doença em uma grande variedade de hospedeiros animais, como mamíferos, aves e insetos. O número de casos de micoses graves, causadas por *C. neoformans* e por outros gêneros de fungos, tem aumentado em todo o mundo, principalmente devido ao aumento do número de indivíduos imunocomprometidos. Adicionalmente, a emergência de novas espécies de patógenos e a seleção de linhagens tolerantes aos antifúngicos comumente utilizados fazem com que o desenvolvimento de novas estratégias para o controle de fungos seja extremamente desejável. A inativação fotodinâmica de fungos é um método novo e promissor, que pode ser utilizado tanto para o controle de micoses (em animais e em vegetais), como para a eliminação de fungos do ambiente. A fotoinativação de fungos é baseada no uso de fotossensibilizadores que se acumulam ou que são preferencialmente metabolizados pelas células do microrganismoalvo. A seguir, o fotossensibilizador é exposto à luz visível, que, na presença de oxigênio, inicia processos fotoquímicos que produzem uma série de espécies reativas de oxigênio capazes de matar as células fúngicas sem provocar danos significativos nos tecidos do hospedeiro. Neste trabalho, foram avaliadas as eficácias do azul de metileno (MB) (em solução e em nanoemulsão), da cloro-alumínio ftalocianina (em nanoemulsão) e do complexo nitrosilo de rutênio (em solução) como fotossensibilizadores para a fotoinativação de células melanizadas e não melanizadas de *C. neoformans*. *C. neoformans* foi suscetível à fotoinativação pela cloro-alumínio ftalocianina, com uma inativação próxima de 100% quando foi utilizada uma combinação apropriada da concentração do fotossensibilizador e da dose de luz. A completa fotoinativação do fungo pela ftalocianina, em condições compatíveis com a terapia fotodinâmica, abre a perspectiva da utilização desse fotossensibilizador para o tratamento de micoses causadas por *C. neoformans*. A fotoinativação pelo MB foi apenas parcial e não ocorreu fotoinativação pelo nitrosilo de rutênio. Nenhum dos fotossensibilizadores matou o fungo na ausência da luz. Também foram feitos experimentos para se verificar a influência do tempo de crescimento e da melanização na tolerância de *C. neoformans* à fotoinativação pelo MB. Houve diferença significativa na tolerância entre diferentes linhagens de *C. neoformans*. Para a maioria dos tratamentos [linhagens e tempo de crescimento (4, 6 ou 8 dias)], não houve diferença significativa entre a tolerância de células melanizadas e não melanizadas. Também não foi observada diferença na tolerância entre células com idade de 4 a 8 dias.

**Summary:** The basidiomycete *Cryptococcus neoformans* is a saprophytic worldwide fungus which is normally isolated from soils contaminated with pigeon excreta and plant detritus. Despite a saprophytic existence, the fungus can infect and cause disease in a wide variety of animal hosts such as mammals, birds and insects. Serious infections caused by *C. neoformans* and by other genera of fungi have emerged all over the world, primarily due to the increased numbers of immunocompromised individuals. Additionally, the emergence of new species and antimycotic-resistant strains of pathogenic fungi makes the development of new funguscontrol techniques highly desirable. Photodynamic inactivation of fungi is a new and promising method that can be used to control localized mycoses or kill fungi in the environment. The photodynamic inactivation of fungi is based on the use of a photosensitizer that accumulates in, or preferentially is metabolized by, cells of the target microorganism. The photosensitizer is then exposed to visible light in the presence of oxygen, and this starts photochemical processes that produce a series of reactive oxygen species (ROS) capable of killing the fungal cells without causing significant damage to host tissues. We report here the

efficacy of methylene blue (MB) (in solution and in nanoemulsion), chloroaluminum phthalocyanine (in nanoemulsion) and nitrosyl ruthenium complex (in solution) as photosensitizers in photoinactivation of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* yeast cells. *C. neoformans* were susceptible to photoinactivation by chloroaluminum phthalocyanine with inactivation close to 100% when the appropriate combination of photosensitizer concentration and light-exposure dose was used. Photoinactivation by MB was only partial and nitrosyl ruthenium complex was ineffective. In the dark, neither photosensitizers inactivated the fungus. Complementary experiments were performed to estimate the effect of the age of the cells and of melanization in the fungus tolerance to photoinactivation by MB. There was a significant difference in the tolerance among strains of *C. neoformans*. For most of the treatments (strains and time of growth) there was no difference between the tolerance of melanized and nonmelanized cells. There was no difference in the tolerance among 4 to 8-day cells either.

**Comissão:** Prof.Dr. Gilberto Úbida Leite Braga  
Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco  
Prof. Dr. Roberto Martinez

**Aluno:** Gislane Lelis Vilela de Oliveira

**Orientador:** Prof.Dr. Gilberto Úbida Leite Braga

**Defesa:** 17/10/2008

**Título:** Avaliação da expressão de genes e proteínas anti- e pró-apoptóticos em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e esclerose múltipla submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas.

**Title:** Evaluation of anti and proapoptotic gene and protein expression in type 1 *diabetes mellitus* and multiple sclerosis patients submitted to autologous hematopoietic stem cell transplantation.

**Resumo:** O *diabetes mellitus* tipo 1 (DM-1) e a esclerose múltipla (EM) são doenças auto-imunes órgão-específicas, inflamatórias, mediadas por células T e B auto-reativas e caracterizadas pela destruição seletiva de células  $\beta$  pancreáticas produtoras de insulina e do sistema nervoso central, respectivamente. Acredita-se que a desregulação da expressão de genes reguladores da maquinaria apoptótica possa contribuir para o desenvolvimento da auto-imunidade, visto que algumas dessas moléculas participam nos processos de tolerância central e periférica de linfócitos auto-reativos. O objetivo deste projeto foi analisar a expressão de moléculas reguladoras das vias intrínseca, extrínseca e da Família de proteínas inibidoras da apoptose (IAP) em 33 indivíduos saudáveis, 15 pacientes com DM-1 e 18 com EM submetidos à terapia de imunossupressão em altas doses seguida do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (IAD/TACTH). As células mononucleares (CMN) foram isoladas do sangue periférico dos controles e de pacientes nos períodos pré-mobilização (pré-mob), pré-condicionamento (pré-cond), D+180, D+360, D+540 e D+720 pós-transplante. As CMN foram utilizadas para extração de RNA, síntese de cDNA, quantificação da expressão por PCR em tempo real dos genes *a1*, *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-x<sub>L</sub>*, *mcl-1*, *bad*, *bak*, *bax*, *bid*, *bik*, *bim*, *bok*, *noxa*, *fas*, *fasL*, *c-FLIP<sub>L</sub>*, *clAP-1* e *clAP-2* e proteína de Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bak, Bim e c-FLIP<sub>L</sub> por *western-blotting*. Os resultados de expressão gênica foram representados por unidades relativas de expressão em medianas nas diferentes amostras. Os pacientes com DM-1 apresentaram diminuição da expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2* (mediana: 0,98; p=0,04), *bcl-w* (0,08; p=0,04), *mcl-1* (1254; p=0,03) e *clAP-1* (1,24; p=0,003) nas CMN dos pacientes no período pré-mob em relação aos indivíduos saudáveis (medianas: *bcl-2*: 7,58; *bcl-w*: 0,52; *mcl-1*: 1659; *clAP-1*: 14,5), enquanto a expressão de *clAP-2* (60,8; p=0,0005) estava aumentada em relação aos controles (23,3). Foi observada redução significativa na expressão dos genes pró-apoptóticos *bad* (0,002; p<0,0001), *bax* (0,01; p=0,002) e *fasL* (1,66; p=0,001) no período pré-mob comparada aos controles sadios (*bad*: 0,23; *bax*: 2,79; *fasL*: 3,56). Os níveis de RNAm de *bid* (0,10; p=0,001) e *bok* (0,72; p=0,006) estavam elevados no pré-mob em relação ao grupo controle (*bid*: 0,004; *bok*: 0,31). As moléculas *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-x<sub>L</sub>*, *mcl-1*, *bad*, *bax*, *bok*, *fasL* e *clAP-1* atingiram níveis de RNAm similares aos controles após o TACTH. Foi verificado que a expressão de *bcl-w*, *clAP-1* e *noxa* estava maior nos pacientes com DM-1 em remissão quando comparados àqueles em recaída. A diminuição da expressão de *a1*, *bcl-2* e *bcl-w* e o aumento de *fas* e *noxa* correlacionaram-se às porcentagens de hemoglobina glicosilada, concentração de auto-anticorpos GAD65, e aos níveis séricos de peptídeo-C após o transplante. Os pacientes com EM mostraram uma expressão reduzida dos genes anti-apoptóticos *bcl-w* (0,11; p=0,02) e *clAP-1* (1,87; p=0,04) no pré-mob comparada aos valores dos controles (*bcl-w*: 0,27; *clAP-1*: 7,75) e maior expressão dos genes *a1* (90,8; p=0,001) e *clAP-2* (58,8; p=0,009) em relação aos controles (*a1*: 12,7; *clAP-2*: 22,3). As moléculas pró-apoptóticas *bad* (0,007; p=0,01) e *bax* (0,0007; p=0,004) mostraram menor expressão nas CMN no período pré-mob do que nos controles (*bad*: 0,27; *bax*: 1,24). Os genes *bid* (20,7; p=0,004), *bik* (0,84; p=0,02) e *bok* (1,77; p=0,0001) possuíam maior expressão no período pré-mob em relação aos indivíduos sadios (*bid*: 2,64; *bik*: 0,33; *bok*: 0,26). Não foram observadas diferenças significativas na expressão das moléculas da via extrínseca da apoptose nos pacientes com EM (p>0,05) nos períodos avaliados. Os valores de expressão de *bcl-w*, *bak*, *bax*, *bik*, *bok* e *clAP-1* atingiram níveis semelhantes aos controles após o transplante. A expressão dos genes *bcl-2*, *clAP-1*, *bad* e *bax* estava maior nos pacientes em remissão da EM quando comparados àqueles em progressão neurológica. O aumento da expressão dos genes pró-

apoptóticos *bax*, *bak* e *bim<sub>EL</sub>* correlacionou-se inversamente aos valores de EDSS dos pacientes com EM após o TACTH. Os resultados de expressão protéica foram equivalentes aos de expressão gênica nas duas doenças, com exceção dos dados das proteínas Bcl-2 e Bim. Em conjunto, os resultados demonstraram a desregulação da expressão de várias moléculas anti- e pró-apoptóticas nas CMN dos pacientes com DM-1 e EM. Esses achados sugerem a associação de alterações nos processos de apoptose celular com o surgimento e persistência de células auto-reativas no DM-1 e EM. Os dados indicam que essas alterações, principalmente a diminuição da expressão de moléculas pró-apoptóticas, como *bak* e *bax*, possam contribuir para a patogênese do DM-1 e EM. Além disso, a terapia de IAD/TACTH foi capaz de modular a expressão da maioria dos genes anormalmente expressos nas CMN dos pacientes com DM-1 e EM, já que esses atingiram níveis de expressão similares ao grupo controle após o transplante. Esta normalização da expressão de vários genes analisados correlacionou-se com a remissão clínica da doença na maioria dos pacientes.

**Summary:** Type 1 diabetes mellitus (T1DM) and multiple sclerosis (MS) are inflammatory, organ-specific autoimmune diseases characterized by selective destruction of insulin-producing pancreatic  $\beta$ -cells and central nervous system, respectively, by autoreactive B and T cells. Deregulation of apoptotic machinery is supposed to contribute to self-tolerance breakdown and autoimmune diseases pathogenesis, since apoptotic molecules have important roles in central and peripheral tolerance mechanisms of autoreactive lymphocytes. The aim of this study was to evaluate the expression of regulatory pro and anti-apoptotic molecules from intrinsic and extrinsic apoptotic pathways and inhibitory apoptosis proteins (IAP Family) in 33 healthy individuals, 15 T1DM and 18 MS patients submitted to high-dose immunosuppression therapy followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation (HDI/AHSCT). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from controls and patients at pre-mobilization (pre-mob), pre-conditioning (pre-cond), D+180, D+360, D+540 and D+720 post-transplantation. PBMC were used for RNA extraction, cDNA synthesis, gene quantification of *a1*, *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-xL*, *bad*, *bak*, *bax*, *bid*, *bik*, *bimEL*, *bok*, *noxa*, *fas*, *fasL*, *c-FLIPL*, *clAP-1* and *clAP-2* by Real Time PCR and protein detection of Bcl-2, Bcl-xL, Bak, BimEL and c-FLIPL by *western-blotting*. Results were expressed as median of relative expression units. Results from T1DM patients indicated that antiapoptotic molecules *bcl-2* (median: 0,98;  $p=0,04$ ), *bcl-w* (0,08;  $p=0,04$ ), *mcl-1* (1254;  $p=0,03$ ) and *clAP-1* (1,24;  $p=0,003$ ) were downregulated at pre-mob compared with healthy controls (medians *bcl-2*:7,58; *bcl-w*: 0,52; *mcl-1*: 1659; *clAP-1*: 14,5), while *clAP-2* (60,8;  $p=0,0005$ ) gene expression was upregulated compared to healthy controls (23,3). We observed a significant decrease in expression of the proapoptotic genes *bad* (0,002;  $p<0,0001$ ), *bax* (0,01;  $p=0,002$ ) and *fasL* (1,66;  $p=0,001$ ) in patients' PBMC at pre-mob period compared to healthy individuals (*bad*:0,23; *bax*: 2,79; *fasL*: 3,56). mRNA levels of *bid* (0,10;  $p=0,001$ ) and *bok* (0,72;  $p=0,006$ ) were elevated at pre-mob period when compared to control group (*bid*: 0,004; *bok*: 0,31). The mRNA levels of the molecules *bcl-2*, *bcl-w*, *bcl-xL*, *mcl-1*, *bad*, *bak*, *bax*, *bok*, *fasL* and *clAP-1* from the patients reached the same levels of the controls after HDI/AHSCT. We observed that *bcl-w*, *clAP-1* and *noxa* gene expression were increased in T1DM patients in remission when compared to relapsed patients. The decrease in expression of antiapoptotic genes (*a1*, *bcl-2* and *bcl-w*) and increase of proapoptotic molecules (*fas* and *noxa*) correlated with glycosilated hemoglobin percentages (Hb A1C), anti-GAD65 autoantibodies and peptide-C serum levels after the transplantation. PBMCs from MS patients showed decreased gene expression of *bcl-w* (0,11;  $p=0,02$ ) and *clAP-1* (1,87;  $p=0,04$ ) at pre-mob period compared to healthy controls (*bcl-w*: 0,27; *clAP-1*: 7,75) and higher expression of *a1* (90,8;  $p=0,001$ ) and *clAP-2* (58,8;  $p=0,009$ ) compared to controls (*a1*: 12,7; *clAP-2*: 22,3). PBMCs showed decreased gene expression of the proapoptotic molecules *bad* (0,007;  $p=0,01$ ) and *bax* (0,0007;  $p=0,004$ ) at pre-mob compared to control group (*bad*: 0,27; *bax*: 1,24). The genes *bid* (20,7;  $p=0,004$ ), *bik* (0,84;  $p=0,01$ ) and *bok* (1,77;  $p=0,0001$ ) showed increased expression at pre-mob compared to healthy controls (*bid*: 2,64; *bik*: 0,33; *bok*: 0,26). Significant differences were not observed in the expression of the extrinsic pathway genes in pre-mob and healthy controls samples ( $p>0,05$ ). *bcl-w*, *bak*, *bax*, *bik*, *bok* and *clAP-1* expression values of the patients reached healthy control values after transplantation. We observed that *bcl-2*, *clAP-1*, *bad* and *bax* gene expression was increased in MS patients in disease remission when compared to patients with neurologic progression. Significant correlation of increased proapoptotic genes expression with decreased EDSS values in MS patients after HDI/AHSCT



was observed. Protein quantification of apoptotic molecules in PBMC of T1DM and MS patients were similar to the gene expression of these molecules, except for Bcl-2 and Bim proteins. Taken together, these data indicate a deregulated expression of anti- and proapoptotic genes in T1DM and MS patients' PBMC. These data suggest an association of deregulated apoptosis with emergence and maintenance of autoreactive lymphocytes in analysed patients. Based on these results, we suggest that this altered gene expression profile, mainly the decreased proapoptotic genes expression, as *bak* and *bax*, may contribute to T1DM and MS pathogenesis. Furthermore, we showed that the HDI/AHSCT therapy was able to modulate and normalize the expression of most genes abnormally expressed in T1DM and MS patients at pre-transplant period. Many of the analyzed genes from the patients achieved expression levels similar to healthy controls. It was found a correlation between the normalization of the expression of many evaluated genes with the disease remission in the majority of the patients. A correlation was observed with the disease remission in the majority of the patients and the normalization of the expression of many of the genes analysed.

**Comissão:** Prof.Dr. Fabíola Attié de Castro  
Prof. Dr. Paulo Louzada Júnior  
Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

**Aluno:** **Kátia Leston Bacelo**

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

**Defesa:** 30/05/2008

**Título:** Avaliação da variabilidade fenotípica e molecular de isolados de *Candida albicans* após período de armazenamento das culturas e em duas ocasiões de coleta

**Title:** Evaluation of phenotypic and molecular variability of *Candida albicans* isolates after culture storage period and in two collection occasions

**Resumo:**

O gênero *Candida* é responsável pela maioria das infecções fúngicas nosocomiais. A identificação do provável foco de origem é de extrema importância para elucidar a epidemiologia desse tipo de infecção e nesse sentido, a utilização de métodos de tipagem, que avaliam características fenotípicas e moleculares dos isolados, é essencial. Assim, o objetivo desse estudo foi tipar isolados de *C. albicans*, antes e após armazenamento e em diferentes ocasiões de coleta, a fim de verificar a manutenção dos biotipos apresentados, e o poder de discriminação dos métodos utilizados. Foi avaliada a microbiota leveduriforme da saliva de 73 estudantes universitários (tempo 0) sendo que após 180 dias (tempo 180) foi realizada nova coleta de saliva daqueles que apresentaram isolamento de *C. albicans* na primeira coleta. Os isolados foram analisados por ocasião das duas coletas, quanto à produção de exoenzimas fosfolipase e proteinase, pela morfologia das colônias, pelo perfil de suscetibilidade frente à anfotericina B, fluconazol e itraconazol e pela tipagem molecular por RAPD. As leveduras, após isoladas, foram armazenadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) e água destilada esterilizada. Após 180 dias, foram realizadas, novamente, as provas de tipagem. Todos isolados de *C. albicans* foram produtores de fosfolipase, nas duas coletas, embora tenha havido oscilação de atividade enzimática entre moderada e alta, no período. O enzimatipo prevalente nos tempos 0 e 180 foi, respectivamente, 22 e 32. Com relação à proteinase, 100% das leveduras apresentaram atividade moderada da enzima no tempo 0. No tempo 180 esse percentual foi de 85%, sendo que os demais não apresentaram atividade dessa enzima. Após armazenamento em ASD e água destilada, foi detectada alteração da atividade de ambas enzimas e conseqüente mudança de enzimatipos, em 40 e 30% dos isolados, respectivamente. Foram identificados 8 morfotipos diferentes de *C. albicans* no tempo 0 e apenas 50% foi mantido no tempo 180. O morfotipo mais comum foi 000-0. Após armazenamento, a maioria dos isolados apresentou alteração no morfotipo. Todos isolados mostraram-se sensíveis aos antifúngicos analisados nos tempos 0 e 180, denotando apenas um antifungotipo, o 111. Somente um isolado após estocagem em ASD, teve mudança de perfil de sensível para dose dependente ao itraconazol de modo que o antifungotipo foi alterado. A tipagem molecular por RAPD, com os primers OPA-09, OPB-11 e OPE-18, mostrou 19 tipos moleculares distintos entre os isolados obtidos na primeira coleta e permitiu identificar que um isolado de *C. albicans* obtido no tempo 180, não era relacionado ao obtido, do mesmo indivíduo, no tempo 0. Os demais mostraram perfil de fragmentos de DNA relacionado entre as coletas. Após estocagem, por ambos métodos, todos isolados mostraram correlação genética com o padrão obtido no tempo 0. Os resultados obtidos demonstram que os métodos de conservação aplicados neste estudo não permitem a manutenção da estabilidade das características fenotípicas avaliadas. Por outro lado, além da estabilidade dos biotipos gerados, a tipagem molecular por RAPD mostrou o melhor índice discriminatório, dentre as metodologias utilizadas, ratificando sua capacidade em diferenciar isolados, de uma mesma espécie e, portanto a sua utilidade em inquéritos epidemiológicos.

**Summary:**

The *Candida* genus is responsible for most nosocomial fungal infections. The identification of the probable origin focus is very important to elucidate the epidemiology of this kind of infection and so, the usage of typing methods that evaluate phenotypic and molecular characteristics are essential. Therefore, the objective of this study was to type *C. albicans* isolates, before and after culture storage and in two different collection occasions to verify the biotype maintenance and the discriminatory power of the utilized methods. The salivary yeast microbiota of 73 university students (time 0) was evaluated and after 180 days (time 180) a

new saliva collection of those that had presented *C. albicans* on the first collection was made. The isolates were analysed, in the two collection occasions on the basis of exoenzymes phospholipase and proteinase production, by colonial morphology, susceptibility profile to amphotericin B, fluconazole and itraconazole and according to molecular typing by RAPD. After isolation, the yeasts were stored on Sabouraud dextrose agar (SDA) and in sterile distilled water. After 180 days, typing tests were carried out again. All *C. albicans* isolates were phospholipase producers, in both collections, even though enzyme activity had oscillated between moderate and high at that period. The prevalent enzymotype at time 0 and 180 were, respectively, 22 and 32. In relation to the proteinase, 100% of the yeasts showed moderate enzyme activity at time 0. At time 180, this percentage was 85%, and the others didn't show enzyme activity. After storage on SDA and in distilled water, it was detected activity alteration of both enzymes and consequent enzymotype change, in 40 and 30% of isolates, respectively. Eight different *C. albicans* morphotypes were identified at time 0 and just 50% were maintained at time 180. The most common morphotype was 000-0. After storage most isolates presented changes in the morphotype. All isolates showed susceptibility to the analysed antifungals at times 0 and 180, showing just one antifungaltyp, the 111. Only one isolate, after storage on SDA had a profile change from susceptible to dose dependent susceptible to itraconazole in a way that the antifungaltyp wasn't changed. The molecular typing by RAPD, with primers OPA-09, OPB-11 and OPE-18, showed 19 distinct molecular types among first collection isolates and allowed to identify that one *C. albicans* isolate from time 180 wasn't related with the isolate obtained at time 0, from the same individual. The others showed DNA fragment profiles related between collection occasions. After storage by both methods, every isolate showed genetic relatedness with the profile obtained at time 0. The obtained results showed that the preservation methods used in this study don't allow stability maintenance of the phenotypical characteristics evaluated. On the other hand, besides biotypes generated stability, the molecular typing by RAPD showed the best discriminatory index, between methodologies used, ratifying its ability in discriminating isolates of the same specie and so, its utility in epidemiological inquiries

**Comissão:** Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura  
Prof. Dra. Nadia Monesi  
Prof. Dr. Roger Figueiredo Castilho

**Aluno:** Leonardo Neves de Andrade

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

**Defesa:** 24/04/2008

**Título:** Estudo fenotípico e molecular de beta-lactamases de espectro estendido e AmpC em enterobactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite

**Title:** Phenotypic and molecular study of extended-spectrum beta-lactamases and AmpC in *Enterobacteriaceae* isolated from patients with suspicion of meningitis

**Resumo:** Membros da família *Enterobacteriaceae* podem causar meningite associada com infecções hospitalares e/ou secundárias. A terapia empírica utilizada em pacientes com suspeita de meningite é, às vezes, ineficiente, devido à produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), que é o mecanismo mais comum de resistência às cefalosporinas de amplo espectro em enterobactérias. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de ESBL e AmpC por enterobactérias isoladas de líquido céfalo-raquidiano e sangue de pacientes com suspeita de meningite da região de Ribeirão Preto, no período de 2000 a 2005. O teste do disco combinado foi utilizado para a detecção fenotípica e a PCR foi utilizada para amplificar genes codificadores de ESBL e AmpC. Três (6,52 %) das 46 enterobactérias isoladas no período estudado foram produtoras de ESBL e abrigavam o gene *bla*<sub>CTX-M-2</sub>. As enterobactérias produtoras de ESBL foram: *S. marcescens* IAL 19, (isolada em Araraquara, 2002), *P. mirabilis* IAL 29 e *E. coli* IAL 45 (isoladas em Franca, respectivamente, 2003 e 2004). O gene *bla*<sub>CTX-M-2</sub> foi detectado em três gêneros diferentes, sugerindo que o gene *bla*<sub>CTX-M</sub> é endêmico na região de Ribeirão Preto. Os dados obtidos por este trabalho são importantes porque existem poucos relatos sobre a produção de ESBL por enterobactérias isoladas de líquido céfalo-raquidiano e sangue de pacientes com suspeita de meningite.

**Summary:** Members of *Enterobacteriaceae* family are cause of cause meningitis associated with nosocomial or secondary infection. The empiric therapy used in patients with suspicion of meningitis is, sometimes, inefficient due to extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing, that is the most common mechanism of resistance to cephalosporins in enterobacteria. The main objective of this study was to evaluate ESBL and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* isolated of cerebrospinal fluid and blood from patients with suspicion of meningitis from the region of Ribeirão Preto city, during 2000 to 2005. Combination disk method was used for phenotypic detection and PCR was used to amplify genes encoding ESBL and AmpC. Three (6.52 %) out of 46 enterobacteria isolated in the period studied were detected as ESBL-producing and harbored the *bla*<sub>CTX-M-2</sub> gene. The ESBL-producing enterobacteria were: *S. marcescens* IAL 19, (isolated in Araraquara city – SP - Brazil, 2002), *P. mirabilis* IAL 29 e *E. coli* IAL 45 (isolated in Franca city – SP- Brazil, respectively, 2003 e 2004). The *bla*<sub>CTX-M-2</sub> gene was detected in three different genera isolated for a long time, suggesting that the *bla*<sub>CTX-M-2</sub> gene is endemic in the region of Ribeirão Preto city. The data generated by this study are important because there are few reports about ESBL-producing enterobacteria isolated of cerebrospinal fluid and blood from patients with suspicion of meningitis.

**Comissão:** Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini  
Profa. Dra. Libera Maria Dalla Costa  
Prof. Dr. José Fernando de Castro Figueiredo

**Aluno:** **Manuela Luiza Toti Rodrigues**

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

**Defesa:** 08/12/2008

**Título:** Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade *in vitro* de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida*

**Title:** Evaluation of methods for *in vitro* susceptibility testing of mouthwashes against species of the gender *Candida*

**Resumo:** A candidíase é uma infecção fúngica oportunista freqüente, causada por leveduras do gênero *Candida*. A utilização de anti-sépticos como medida complementar na higiene oral é cada vez mais difundida. Sendo assim, é de grande importância a avaliação das metodologias que são utilizadas para avaliação da atividade antifúngica. A avaliação *in vitro* da sensibilidade de leveduras a anti-sépticos tem sido pouco relatada e os resultados nem sempre são concordantes, pois as metodologias são divergentes. O objetivo desse estudo foi avaliar três metodologias: macro e microdiluição em caldo e difusão em ágar por meio de poços, com utilização dos meios de cultura RPMI 1640 e Mueller-Hinton para suscetibilidade dos antisépticos bucais Listerine®, Malvatricin® Dentes Sensíveis, Noplak®Max, Oral B®, Periogard®, Plax® e Reach® frente a *C. albicans* ATCC 64548, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* ATCC 750. Em relação à comparação das concentrações inibitórias mínimas de cada meio de cultura, os índices *kappa* foram bons ou excelentes (0,73 a 1,00). Na metodologia da difusão em ágar o coeficiente de correlação de concordância entre os resultados dos meios de cultura também foi excelente (0,95 a 0,99). Concluímos que ambos os meios de cultura podem ser utilizados na avaliação da suscetibilidade de antisépticos bucais frente espécies de *Candida*, pois apresentaram índices de concordância e correlação de bom à excelente. Quanto à correlação entre as metodologias de macro e microdiluição, o *kappa* foi excelente (1,00) para todas as cepas no meio Mueller-Hinton e variou de 0,42 a 0,72 (bom a excelente) no meio RPMI-1640. As CIMs geradas pela macro e microdiluição em caldo são concordantes possibilitando a utilização de ambas as metodologias na avaliação de anti-sépticos bucais, no entanto a microdiluição detectou a ação inibitória de antisépticos voláteis em menores concentrações. A utilização da difusão em ágar é discutível visto que os anti-sépticos voláteis Listerine® e Malvatricin® não apresentaram atividade inibitória nesta metodologia. Todos os anti-sépticos avaliados apresentaram atividade fungistática e fungicida *in vitro* pelas metodologias de diluição frente a cepas ATCC de *Candida* quando avaliado na formulação disponibilizada pelos fabricantes. Os anti-sépticos bucais Oral B® e Periogard® apresentaram ações inibitórias (CIM) e fungicidas (CFM) de 1,25% para todas as cepas, meios e metodologias. O Noplak® e o Plax®, CIM e CFM variando de 1,25% a 2,5% para todas as cepas, meios e metodologias. Os anti-sépticos Listerine® e Malvatricin® apresentaram CIM de 5% a 50% e CFM de 5% a 100% dependendo do meio e metodologia. O anti-séptico Reach® apresentou CIM e CFM variando de 1,25% a 50% dependendo da cepa avaliada. Estudos com maior número de isolados, maior diversidade de espécies, concentrações intermediárias de antiséptico e resultados interlaboratoriais poderão contribuir na padronização de métodos para avaliação de anti-sépticos bucais.

**Summary:** Candidosis is a frequent opportunistic fungal infection caused by yeasts of the gender *Candida*. The use of mouthwashes as a preventive measure in oral hygiene has been more and more diffused. Therefore it is of great importance the evaluation of the methodologies that are used on the antifungal evaluation. The *in vitro* evaluation of yeast susceptibility to mouthwashes has been little reported and the results are not always in agreement. The goal of this study was to evaluate three methodologies: broth macro and microdilution and agar well diffusion, using the media RPMI 1640 and Mueller-Hinton on the susceptibility of the mouthwashes Listerine®, Malvatricin® Dentes Sensíveis, Noplak®Max, Oral B®, Periogard®, Plax® e Reach® against *C. albicans* ATCC 64548, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* ATCC 750. The *kappa* indexes for the comparison between the minimal inhibitory concentrations obtained with each culture medium were good to excellent (0,73 to 1,00). On the agar well diffusion method, the

concordance correlation coefficients between the results obtained with the different media were also excellent (0,95 to 0,99). We concluded that both culture media can be used to evaluate the susceptibility of mouthwashes against species of *Candida* because they have concordance and correlations that go from good to excellent. The *kappa* indexes for the correlation between the broth macro and microdilution methodologies were excellent (1,00) for all the isolates in the Mueller-Hinton media and varied from 0,42 to 0,72 (good to excellent) with RPMI 1640. The MICs generated by broth macro and microdilution agree which makes it possible to use both methodologies on the evaluation of mouthwashes; however the microdilution detects the inhibitory action of volatile mouthwashes at smaller concentrations. The use of the agar well diffusion method is not advised since the volatile mouthwashes Listerine® and Malvatricin® have not presented inhibitory action in that methodology. All the evaluated mouthwashes presented fungistatic and fungicide activity at the formulation available in the market. The mouthwashes Oral B® and Periogard® presented MICs and MFCs of 1,25% for all strains, methodologies and media. Noplak® and Plax®, MIC and MFC that ranged from 1,25% to 2,5% for all strains, methodologies and media. The mouthwashes Listerine® and Malvatricin® MICs ranged from 5% to 50% and MFCs from 5% to 100% depending on media and methodology. The mouthwash Reach® presented MICs and MFCs ranging from 1,25% to 50% depending on the strain evaluated. Studies with a higher number of strains, bigger variety of species, intermediary concentrations of mouthwashes and interlaboratory results can contribute to the standardization of methods to evaluate mouthwashes.

**Comissão:** Profa. Dra. Regina Celia Candido  
Prof. Dr. Reginaldo dos Santos Pedroso  
Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca

**Aluno:** Maria Aparecida de Oliveira

**Orientador:** Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

**Defesa:** 22/12/2008

**Título:** Avaliação da segurança microbiológica de hortaliças minimamente processadas, pela enumeração de microrganismos indicadores, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* por métodos convencionais e aplicação da PCR em tempo real na quantificação de *Listeria monocytogenes*.

**Title:** Evaluation of the microbiological safety of minimally processed vegetables by the enumeration of indicative microorganisms, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by conventional methods and quantification of *Listeria monocytogenes* by real-time PCR.

**Resumo:** A vida moderna tem gerado mudanças importantes nos hábitos alimentares em todo o mundo e observa-se um aumento da demanda por alimentos prontos para o consumo, tais como frutas e hortaliças minimamente processadas. As condições de embalagem e armazenamento destes produtos podem favorecer a multiplicação de bactérias psicotróficas, destacando-se o patógeno *Listeria monocytogenes*. Para estudos de avaliação de riscos microbiológicos relativos a *L. monocytogenes*, dados quantitativos são fundamentais, mas, os métodos para enumeração disponíveis atualmente são trabalhosos e morosos. Há grande interesse no desenvolvimento de métodos rápidos para a determinação das populações de *L. monocytogenes*, o que pode reduzir significativamente o tempo de análise. Neste trabalho, foram analisadas 162 amostras de hortaliças minimamente processadas adquiridas no comércio varejista de Ribeirão Preto/SP, no período de setembro de 2007 a agosto de 2008. Foram realizados ensaios convencionais para enumeração de coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli* e bactérias aeróbias psicotróficas. Foi realizada a detecção de *Listeria* sp. por imunoenensaio (Oxoid *Listeria* Rapid Test) e de *Salmonella* por método convencional. Alíquotas congeladas de amostras positivas para *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. foram também avaliadas quantitativamente empregando-se métodos convencionais. Para quantificação de *L. monocytogenes* foi utilizado o método da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) em tempo real, com *primers* de DNA baseados em 16S rRNA. Para a comparação do método de PCR em tempo real e método convencional de cultivo, foram inoculadas seis amostras de hortaliças minimamente processadas (alface, cheiro-verde, couve, almeirão, repolho e acelga) com três níveis de inoculação. Os resultados obtidos entre os dois métodos de quantificação desenvolvidos apresentaram pouca variação e todos os resultados foram concordantes considerando-se o intervalo de confiança de 95% da técnica do NMP (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001). Dentre as 162 amostras de hortaliças analisadas, *L. monocytogenes* foi detectada em uma amostra de couve e uma de cheiro-verde, com populações de  $1,5 \times 10^3$  e 0,43 NMP/g, respectivamente. *Salmonella* sp. foi isolada de duas amostras de almeirão, com populações de 0,09 e 4,6 NMP/g. Contaminação por coliformes totais foi detectada em 132 (81,5%) amostras e por coliformes termotolerantes em 107 (66%) amostras. *Escherichia coli* foi confirmada em 86 (53,1%) amostras, enquanto que 158 (96,7%) amostras apresentaram população de bactérias psicotróficas maior que 5 log UFC/g. A PCR em tempo real foi otimizada com a preparação comercial ABSOLUTE™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, Reino Unido) e os *primers* utilizados mostraram ser específicos para *L. monocytogenes*. As populações de microrganismos encontradas nestes alimentos indicaram a baixa qualidade microbiológica e evidenciaram a importância da implantação de programas para garantia da inocuidade de alimentos na cadeia produtiva das hortaliças minimamente processadas. A PCR em tempo real mostrou ser de fácil execução e diminuiu o tempo de obtenção de resultados para pouco mais que 48 horas em comparação com o tempo gasto (7 dias) quando as hortaliças foram analisadas por meio do método convencional de cultivo.

**Summary:** Modern lifestyles have deeply changed eating habits worldwide, with an increasing demand for ready-to-eat foods, including minimally processed fruits and leafy greens. Packaging and storage conditions of these products may favor the growth of psychrotrophic bacteria, such as the pathogen *Listeria monocytogenes*. For microbiological risk assessment, it is crucial to generate quantitative data on foodborne pathogens, but the enumeration methods currently available are labor and time consuming. There is great interest in the development of reliable

and fast methods for enumeration of *L. monocytogenes*, in order to shorten the time needed to obtain quantitative results. In this study 162, samples of leafy vegetables minimally processed were acquired at retail market in Ribeirão Preto from September, 2007 to August 2008 and they were analysed by conventional enumerating methods for total and thermophilic coliforms, *Escherichia coli* and psychrotrophic aerobic bacteria. Presence or absence of *Listeria* spp. was evaluated by immunoassay (Oxoid Listeria Rapid test) and detection of *Salmonella* was performed by conventional methods. Frozen aliquots of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* positive samples were quantitatively evaluated by conventional methods and *L. monocytogenes* was also enumerated by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) with DNA primers based on 16S rRNA. Real-time PCR method was applied to analyze six artificially contaminated vegetables and the results obtained with this methodology were similar to the ones obtained with conventional most probably number (MPN) technique with a confidence interval of 95% (SWANSON; PETRAN; HANLIN, 2001). Of the 162 samples analyzed, *L. monocytogenes* was detected in one sample of collard green and in one mixed bunch of parsley plus spring onion ( $1.5 \times 10^3$  and 0.43 MPN/g, respectively). *Salmonella* sp was detected in two samples of common chicory with populations of 0.09 and 4.6 MPN/g. One hundred and thirty two samples (81.5%) showed contamination by total coliforms and 107 (66%) by thermophilic coliforms. *Escherichia coli* was confirmed in 86 (53.1%) samples while 156 (96.7%) showed populations of psychrotrophic bacteria above of 5 log CFU/g. PCR was optimized with a commercial preparation ABSOLUTE™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, UK) and the primers utilized were specific for *L. monocytogenes*. These results showed the low microbiologic quality of minimally processed vegetables samples studied and indicate an urge for implementation of quality programs from producer to processors of these ready-to-eat foods. Real-time In comparison with the conventional culture method, real-time PCR was more easily performed and the time required to obtain the results was reduced to ca. 48 hours, in comparison with 7 days for conventional method.

**Comissão:** Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis  
Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão  
Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto



**Aluno:** Michele Paulo

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

**Defesa:** 03/04/2008

**Título:** Efeitos das isoflavonas da soja (*Glycine max*) na síntese de fatores vasoativos derivados de células endoteliais humanas da linhagem ECV304

**Title:** Effects of soy isoflavones (*Glycine max*) in the synthesis of vasoactive factors derived from human endothelial cells line ECV304

**Resumo:** As mulheres na fase reprodutiva apresentam menor incidência de doenças cardiovasculares (DCV), em relação aos homens de mesma idade. Porém, essa vantagem desaparece na pós-menopausa, sugerindo que os hormônios sexuais femininos exercem algum efeito cardioprotetor. Um dos mecanismos propostos para explicar essa proteção é o fato dos estrógenos promoverem a produção de importantes fatores vasoativos pelo endotélio vascular, entre eles o óxido nítrico e a prostaglandina I<sub>2</sub>. Com a diminuição da quantidade de estrógenos circulante, as mulheres na pós-menopausa, estão mais suscetíveis à disfunção endotelial e a doenças cardiovasculares. Estudos têm demonstrado que a terapia de reposição hormonal (TRH) utilizada por mulheres na pós-menopausa combate os sintomas deste período, melhora o quadro de disfunção endotelial e o perfil lipídico e aumenta a síntese de fatores vasoativos, que auxiliam na prevenção da DCV. Entretanto a TRH vem sendo questionada por grandes estudos como o WHI (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators) e o HERS (*Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*), que mostraram um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama e endometrial em mulheres fazendo uso da TRH. Entre as terapias alternativas para combater os sintomas indesejáveis da menopausa e as implicações mórbidas que acompanham esse período, sem expor as pacientes aos efeitos colaterais da TRH, a literatura aponta os fitoestrógenos, principalmente os extraídos da soja (*Glycine max*). O objetivo geral deste estudo é avaliar a ação das isoflavonas da soja, que vem sendo utilizadas por mulheres na pós-menopausa, na produção de óxido nítrico, prostaglandina E<sub>2</sub> e endotelina-1, por células endoteliais, utilizando um modelo "in vitro", células endoteliais da linhagem ECV304.

**Summary:** During their reproductive years, women have a lower incidence of coronary heart disease (CHD) compared to men of similar age. However, this advantage disappears in post-menopause, suggesting that female sex hormones exert some cardio protective effect. One of the mechanisms proposed to explain this protection is the fact that estrogens promote the production of important vasoactive factors by vascular endothelium, including nitric oxide and prostaglandin I<sub>2</sub>. By decreasing circulating estrogen, women in post-menopause are more susceptible of endothelial dysfunction and cardiovascular diseases. Studies have shown that the hormone replacement therapy (HRT) used by post-menopausal women in combating the symptoms of this period, improve endothelial dysfunction and lipid profile and increases the synthesis of vasoactive factors, which help in the prevention of CHD. Meanwhile the HRT has been questioned by two large trials, the WHI (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators) and HERS (*Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*), which showed an increased risk of developing breast cancer and endometrial cancer in women using HRT. Among the alternative therapies to combat the symptoms of menopause and undesirable morbid implications that accompany this period, without exposing the patients to the side effects of HRT, the literature suggests the phytoestrogens, especially those from the soybean (*Glycine max*). The aim of this study is to evaluate the effect of isoflavones from soy, which are used by women in post-menopause, in the production of nitric oxide, prostaglandin E<sub>2</sub> and endothelin-1 by endothelial cells, using an "in vitro" model: human endothelial cell line ECV304.

**Comissão:** Profa. Dra. Maria Regina Torqueti Tolo  
Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha  
Profa. Dra. Carolina Sales Vieira Macedo

**Aluno:** Vânia Brazão

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

**Defesa:** 05/08/2008

**Título:** Administração de zinco e dehidroepiandrosterona (DHEA): exerceriam eles um papel sinérgico na resposta imune de ratos senis infectados com *Trypanosoma cruzi*?

**Title:** Administration of zinc and dehydroepiandrosterone (DHEA): would they exert a synergic role in the immune response of aged Wistar rats infected with *Trypanosoma cruzi*?

**Resumo:** A modulação das respostas imunológicas frente à administração de substâncias farmacologicamente ativas em modelos experimentais infectados por *Trypanosoma cruzi* tem contribuído de maneira importante nas investigações de novas terapias para a doença de Chagas. O presente estudo teve como objetivo avaliar um possível efeito sinérgico imunoestimulatório subsequente à administração de sulfato de zinco e DHEA durante o curso da infecção. O DHEA tem sido amplamente estudado e possui ação comprovada no direcionamento da resposta imune Th1, sendo muito efetivo para diferentes patógenos tais como vírus, bactérias e protozoários. O zinco é considerado um oligoelemento de extrema importância para a manutenção das funções imunes. Age como um inibidor da apoptose celular além de coordenar a seleção fisiológica de células intra-tímicas. Durante a fase aguda da infecção, zinco e DHEA apresentaram atividade estimulatória sobre a imunidade do hospedeiro, potencializando a resposta imune gerada contra o parasita. Comprovamos também a ação sinérgica de DHEA e zinco, através dos parâmetros analisados tais como parasitemia sangüínea e tecidual, além de fatores imunológicos como aumento nas concentrações de NO, IFN- $\gamma$ , IL-12, e número de macrófagos. Este efeito imuno-modulador durante a fase aguda da infecção chagásica pode contribuir para a prevenção dos danos teciduais observados na fase crônica da doença.

**Summary:** The modulation of the immune responses as well as the administration of pharmacologically active substances in infected *T. cruzi* experimental models has contributed to important investigations of new therapies in the treatment of Chagas' disease. However, the use of antiparasitary drugs in the chronic indeterminate or in the cardiac chronic phases of Chagas disease is still a controversial issue. This study has as objectives to evaluate a possible synergic immunostimulatory effect after the administration of zinc and DHEA during the course of the infection. A bulk of evidences has been presented confirming the effectiveness action of DHEA on the Th1 immune response against a wide range of pathogens such like viruses, bacteria and protozoans. Zinc is considered an oligoelement of essential importance in the maintenance of the immune functions, as well as inhibiting cell apoptosis besides the function of coordinate the physiological selection of thymic T cells. During the acute phase of infection, zinc and DHEA displayed enhanced stimulatory activity on host's immune response. A synergic action of zinc and DHEA was also observed through the evaluations of distinct parameters such as blood and tissue parasitism, number of macrophages and NO levels as well as elevated concentrations of some immunological interleukins such as IFN- $\gamma$  and IL-12. This work also demonstrates that the enhanced immunostimulatory effect observed during the acute phase certainly contributes in the prevention of tissue damage that normally occurs during the late chronic phase

**Comissão:** Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura  
Prof. Dra. Nadia Monesi  
Prof. Dr. Roger Figueiredo Castilho