



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

*Programa de Pós Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia*

## **MESTRADO – 2010**

**Aluno:** Ana Paula Zambuzi Cardoso Marsola

**Orientador:** Evandro José Cesarino

**Defesa:** 12/11/2010

**Título:** Análise econômica e da Influência sobre a morbimortalidade cardiovascular de estatinas e fibratos utilizados no tratamento de portadores de dislipidemia em Ribeirão Preto-SP

**Title:** Economic analysis and influence on cardiovascular morbimortality of statins and fibrates used to treat patients with dyslipidemia in Ribeirão Preto-SP.

**Resumo:** As dislipidemias são importantes fatores de risco para desenvolvimento de Doenças Cardiovasculares (DCV) comprovado através de grandes estudos observacionais. Estudos demonstraram que a prescrição regular de hipolipemiantes (estatinas e fibratos) pode reduzir a ocorrência de eventos cardiovasculares e diminuir a mortalidade. Objetivou-se realizar uma análise econômica e a influência de atorvastatina, simvastatina, bezafibrato e ciprofibrato sobre a morbimortalidade cardiovascular em indivíduos que fizeram uso destes medicamentos em 2007 dispensados no Programa de Medicamentos Excepcionais do Ministério da Saúde distribuídos pela Farmácia Ambulatorial do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Trata-se de um estudo observacional, descritivo e de caráter transversal. A casuística foi composta por 332 (31,11%) indivíduos sorteados aleatoriamente dentre 1067 pacientes (erro padrão de 5%), de ambos os sexos, encaminhados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e consultórios particulares. Os indivíduos selecionados foram submetidos a uma entrevista e seus prontuários médicos analisados. Dos 310 pacientes entrevistados, 157 (51%) eram do sexo masculino. A faixa etária variou de 15 a 63 anos ( $X = 62,0 \pm 12,23$ ). Constatou-se 5 óbitos em 2007, sendo 100% do sexo masculino, com idade variando de 57 a 74 anos ( $X = 68,2 \pm 6,95$ ). 227 (73,22%) pacientes fizeram uso de estatinas, 54 (17,42%) de fibratos e 31 (10%) controles (sem uso de medicamentos). De 246 (79,35%) indivíduos analisados, a média do índice de massa corpórea (IMC) foi  $>28,7 \text{ Kg/m}^2$ ; 121 (39%) pacientes fizeram uso de simvastatina, 104 (34%) atorvastatina, 25 (8%) ciprofibrato, 29 (9%) bezafibrato. O perfil lipídico apresentou-se mais elevado no grupo atorvastatina e bezafibrato. Em relação aos eventos e/ou procedimentos, houve um total de 253 (52,17%) pacientes apresentaram aterosclerose documentada, 60 (23,71%), angina pectoris, 28 (11,47%) insuficiência cardíaca, 6 (2,44%) infarto agudo do miocárdio, 6 (2,44%) aneurisma arterial e 4 (1,62%) acidente vascular encefálico. Quanto aos procedimentos, constatou-se a realização de 11 cateterismos cardíacos e 7 angioplastias. Quanto à análise econômica, o tratamento do grupo atorvastatina apresentou o maior custo (R\$994,69 paciente/ano), já no grupo da simvastatina (R\$337,61 paciente/ano) houve maiores gastos com exames laboratoriais e complementares. Entre o grupo dos fibratos não houve diferenças importantes com relação ao custo do tratamento. Conclui-se que entre os indivíduos estudados, prevaleceu a população idosa, maior número de óbitos no sexo masculino; houve a prevalência de sobrepeso/obesidade ( $\text{IMC} > 25 \text{ kg/m}^2$ ); aterosclerose documentada e angina pectoris foram os eventos cardiovasculares predominantes e o cateterismo cardíaco o procedimento mais realizado. O tratamento com atorvastatina foi o mais oneroso, entretanto, seus pacientes apresentaram menor ocorrência de eventos e procedimentos cardiovasculares, além do menor custo com exames laboratoriais.

**Summary:** Dyslipidemias are a major risk factor for the development of cardiovascular diseases. Several studies have shown that regular prescribing of lipid-lowering drugs (statins and fibrates) can reduce cardiovascular events and decrease overall mortality. The objectives of this study were to perform a economic analysis and the influence of atorvastatin, simvastatin,

bezafibrate or ciprofibrate on the cardiovascular morbimortality in individuals who used these drugs during the year of 2007, dispensed by the Outpatient Pharmacy of Clinical Hospital of FMRP-USP according to the Exceptional Medicines Program of Ministry of Health. This is an observational and descriptive study of transversal character. The sample was composed of 332 (31,11%) individuals, randomly selected among 1067 patients (standard error of 5%), of both sexes, living in Ribeirão Preto-SP conveyed by the Single System of Health (SUS) and private clinics. Individuals were submitted to na interview and had their medical records examined. Among the 310 patients interviewed, 157 (51%) were males with ages ranging from 15 to 63 years old ( $X= 62,0 \pm 12,23$ ). Five deaths were reported in 2007, and of those patients, 100% were males, with ages ranging from 57 to 74 years old ( $X= 68,2 \pm 6,95$ ). 227 (73,22%) patients were using statins, 54 (17,42%) fibrates and 31 (10%) controls (no use of drugs). The average of body mass index (BMI) of 246 (79,35%) patients evaluated was above 28,7 Kg/m<sup>2</sup>; 121 (39%) patients were using simvastatin, 104 (34%) atorvastatin, 25 (8%) ciprofibrate and 29 (9%) bezafibrate. The lipid profile was more elevated in atorvastatin and bezafibrate groups. A total of 253 events and/or procedures were found. 132 (52,17%) patients had atherosclerosis documented, 60 (23,71%) angina pectoris, 28 (11,47%) heart failure, 6 (2,44%) acute myocardial infarction, 6 (2,44%) arterial aneurysm, 4 (1,62%) vascular brain accident. Regarding the procedures, 11 cardiac catheterism and 7 angioplasties were verified. Regarding the economic analysis, atorvastatin treatment group showed to be the most expensive one (R\$ 994,69 patient/year). For the simvastatin group (R\$337,61 patient/year), there were increased costs for lab and complementary tests, while among the group of fibrates there were no substantial differences in the cost of treatments. It is concluded that among the evaluated individuals, there was a prevalence of elderly people, deaths of male patients and overweight (BMI > 25kg/m<sup>2</sup>). The presence of atherosclerosis and angina pectoris were the predominant cardiovascular events and the cardiac catheterism procedure was the most performed. Although treatment with atorvastatin was the most expensive, patients in that treatment had a lower incidence of cardiovascular events and procedures, and lower costs with lab and complementary tests.

**Comissão:** Evandro José Cesarino  
Harnôlido Colares Coêlho  
Alexandre Chibebe Nicolella

**Aluno:** Helda Liz Alfonso Castro

**Orientador:** Victor Hugo Aquino Quintana

**Defesa:** 15/10/2010

**Título:** Caracterização molecular de Dengue tipo 3 isolados no Brasil e no Paraguai

**Title:** Molecular characterization of dengue type 3 isolated in Brazilian and Paraguay

**Resumo:** O vírus da dengue (DENV), pertencente ao gênero Flavivirus da família Flaviviridae, é a arbovirose de maior impacto em saúde pública na atualidade. A infecção com qualquer dos quatro sorotipos de dengue (DENV-1, -2, -3 e -4) pode ser assintomática ou causar doença febril (DF) que pode evoluir para uma forma mais grave, e algumas vezes fatais, caracterizada por derrame capilar, trombocitopenia. A introdução do DENV-3, genótipo III, nas Américas coincidiu com um aumento no número de casos graves da doença. Este vírus causou uma grande epidemia em 2002 no Rio de Janeiro e posteriormente se espalhou em todas as regiões do país, chegando inclusive ao Paraguai. Diversos estudos filogenéticos e evolutivos foram realizados com o DENV-3 nas Américas, mas utilizando sequências genômicas parciais. Neste trabalho temos por objetivo analisar o relacionamento filogenético e evolutivo de DENV-3 isolados no Brasil e no Paraguai analisando a sequência genômica completa. A sequência de vírus isolados no Brasil (n=9) e no Paraguai (n=3) foram comparadas com 527 sequências depositadas no GenBank. As 12 cepas virais isoladas no Brasil e no Paraguai pertencem ao grupo americano do genótipo III. Analisando a árvore filogenética dos DENV-3 observamos três genótipos e diversas linhagens, sub-linhagens e clados dentro de cada genótipo. A distância genética entre os genótipos foi de 7,3 a 7,5%, entre as linhagens de 3,2 a 5,3%, entre as sub-linhagens 2,5 a 3,2% e entre os clados de 1,0 a 1,9%. A taxa evolutiva dos vírus variou entre  $1,2 \times 10^{-4}$  a  $8,2 \times 10^{-4}$  subs/sítio/ano. O ancestral comum do genótipo I teria surgido entre 1849-1945, do genótipo II entre 1916-1960, e do genótipo III entre 1876-1923. Os diferentes grupos genéticos apresentam motif de aminoácidos característicos. Estes dados serão de grande utilidade para uma melhor caracterização dos DENV-3 em futuras epidemias e, inclusive, poderão ser utilizados para seleção de candidatos a vacina.

**Summary:** Dyslipidemias are a major risk factor for the development of cardiovascular diseases. Several studies have shown that regular prescribing of lipid-lowering drugs (statins and fibrates) can reduce cardiovascular events and decrease overall mortality. The objectives of this study were to perform an economic analysis and the influence of atorvastatin, simvastatin, bezafibrate or ciprofibrate on the cardiovascular morbimortality in individuals who used these drugs during the year of 2007, dispensed by the Outpatient Pharmacy of Clinical Hospital of FMRP-USP according to the Exceptional Medicines Program of Ministry of Health. This is an observational and descriptive study of transversal character. The sample was composed of 332 (31,11%) individuals, randomly selected among 1067 patients (standard error of 5%), of both sexes, living in Ribeirão Preto-SP conveyed by the Single System of Health (SUS) and private clinics. Individuals were submitted to an interview and had their medical records examined. Among the 310 patients interviewed, 157 (51%) were males with ages ranging from 15 to 63 years old ( $X = 62,0 \pm 12,23$ ). Five deaths were reported in 2007, and of those patients, 100% were males, with ages ranging from 57 to 74 years old ( $X = 68,2 \pm 6,95$ ). 227 (73,22%) patients were using statins, 54 (17,42%) fibrates and 31 (10%) controls (no use of drugs). The average of body mass index (BMI) of 246 (79,35%) patients evaluated was above 28,7 Kg/m<sup>2</sup>; 121 (39%) patients were using simvastatin, 104 (34%) atorvastatin, 25 (8%) ciprofibrate and 29 (9%) bezafibrate. The lipid profile was more elevated in atorvastatin and bezafibrate groups. A total of 253 events and/or procedures were found. 132 (52,17%) patients had atherosclerosis documented, 60 (23,71%) angina pectoris, 28 (11,47%) heart failure, 6 (2,44%) acute myocardial infarction, 6 (2,44%) arterial aneurysm, 4 (1,62%) vascular brain accident. Regarding the procedures, 11 cardiac catheterism and 7 angioplasties were verified. Regarding the economic analysis, atorvastatin treatment group showed to be the most expensive one (R\$ 994,69 patient/year). For the simvastatin group (R\$337,61 patient/year), there were increased costs for lab and complementary tests, while among the group of fibrates there were no substantial differences in the cost of treatments. It is concluded that among the evaluated individuals, there was a prevalence of elderly people,

deaths of male patients and overweight (BMI > 25kg/m<sup>2</sup>). The presence of atherosclerosis and angina pectoris were the predominant cardiovascular events and the cardiac catheterism procedure was the most performed. Although treatment with atorvastatin was the most expensive, patients in that treatment had a lower incidence of cardiovascular events and procedures, and lower costs with lab and complementary tests.

**Comissão:** Victor Hugo Aquino Quintana  
Mauricio Lacerda Nogueira  
Simone Kashima Haddad

**Aluno:** Renata Galetti

**Orientador:** Ana Lúcia da Costa Darini

**Defesa:** 20/09/2010

**Título:** Estudo de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo-beta-lactamase e de genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos

**Title:** Study of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and genes involved in carbapenem resistance.

**Resumo:** As metalo-beta-lactamases (MBL) são carbapenemases pertencentes à classe B de Ambler e ao grupo 3 de Bush-Jacoby, as duas classificações mais utilizadas atualmente. Essas enzimas conferem, às bactérias, resistência às cefalosporinas, penicilinas e carbapenêmicos, mas não conferem resistência ao monobactam aztreonam. Além disso, não são inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamases comercialmente disponíveis, porém possuem sensibilidade ao ácido etileno diamino tetracético (EDTA) e ácido mercaptopropiônico (MPA). Atualmente são conhecidas nove subclasses de MBL: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM e DIM. Essas MBL têm se tornado clinicamente importantes, principalmente, em *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., e alguns gêneros da família Enterobacteriaceae. O principal objetivo desse trabalho foi a caracterização genética e epidemiológica de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, produtoras de MBL, isoladas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo no período de abril a agosto de 2007. Das 54 *P. aeruginosa* estudadas, 24 foram positivas na triagem fenotípica para MBL e 5 apresentaram o gene blaSPM-1 detectado por PCR e confirmado pelo seqüenciamento. O inibidor mais eficiente na triagem fenotípica foi o EDTA. A baixa correlação entre o teste fenotípico e molecular pode ser explicada pela capacidade que o EDTA possui de aumentar a permeabilidade da membrana celular e assim tornar a bactéria sensível a baixas concentrações do antibiótico. Além disso, a diferença entre o número de isolados resistentes aos carbapenêmicos e/ou ceftazidima e os que apresentaram a MBL podem ser explicados pela associação de outros mecanismos de resistência, como hiperprodução de AmpC, redução da expressão de porinas e/ou aumento do efluxo de antibióticos. De acordo com o perfil de macrorrestrrição obtido por eletroforese em campo pulsado as 5 linhagens produtoras de SPM-1 estão agrupadas em 3 perfis clonais distribuídos em diferentes clínicas no hospital não sendo identificado nenhum clone predominante. Finalizando, entre os isolados resistentes aos carbapenêmicos e/ou à ceftazidima a frequência de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 foi de 9,3%, indicando que as medidas aplicadas pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) desta instituição estão sendo eficientes, porém mesmo assim é necessário que a CCIH esteja sempre atenta a relatos de resistência aos carbapenêmicos pois, linhagens produtoras de MBL restringem muito as opções terapêuticas para infecções causadas por elas.

**Summary:** Metallo-beta-lactamase (MBL) are carbapenemases which belong to the Bush-Jacoby-Medeiros group 3 and to the molecular class B, according Ambler. These two classifications are the most used nowadays. These enzymes confer microorganisms resistant to cephalosporins, penicillins and carbapenems, but not to aztreonam, a monobactam. Moreover, they are not inhibited by commercially available  $\beta$ -lactamases inhibitors, but they are susceptible to EDTA and MPA. Currently this is known nine subclasses of MBL: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM and DIM. These MBL became clinically important, especially in microorganisms such as *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and genera of the family Enterobacteriaceae. The main objective of this study was genetic and epidemiologic characterization of MBL-producing-*P. aeruginosa*, isolated in the Hospital of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - University of São Paulo in the period from April to August 2007. Among the 54 *P. aeruginosa* studied, 24 were positive for phenotypic MBL screening and 5 presented blaSPM-1 gene, detected by PCR and confirmed by sequencing. The most efficient inhibitor in phenotypic screening was EDTA. The low correlation between phenotypic and molecular testing can be explained by the ability of EDTA to increase the permeability of cell membranes and rendering the bacteria as sensitive to low concentrations of antibiotic. Furthermore, the difference between number of isolates carbapenem resistant and / or ceftazidime resistant and the number of MBL-producing-*P. aeruginosa* can be

explained by the association with other resistance mechanisms, such as AmpC overproduction, reduced expression of porins and / or increased antibiotics efflux. According to profile of macrorestriction after pulsed-field gel electrophoresis, five SPM-1-producing-*P.aeruginosa* are grouped in three different clonal profiles. These clonal strains were proceeded from different clinics at the hospital and no predominant clone was identified. Finally, among the carbapenems and/or ceftazidime resistant isolates the frequency of SPM-1-producing-*P.aeruginosa* was 9.3%, suggesting that the hospital care of infection control has being effective.

**Comissão:** Ana Lucia da Costa Darini  
Eliana Guedes Stehling  
Paulo Pinto Gontijo Filho

**Aluno:** Lorena Rocha Ayres

**Orientador:** Luciana Simon Pereira Crott

**Defesa:** 23/08/2010

**Título:** Modulação de eventos da imunidade humoral e celular por venenos brutos e componentes dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops pirajai*

**Title:** Modulation of events of humoral and cellular immunity by crude venom and components of *Bothrops jararacussu* and *Bothrops pirajai*

**Resumo:** Serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por 90% dos acidentes ofídicos no Brasil. Seus venenos provocam efeitos locais em humanos e animais, como hemorragia, edema, dor e necrose, caracterizando uma resposta inflamatória, cujo mecanismo não está bem definido. Esses efeitos estão relacionados com a ação combinada de proteases, substâncias que induzem hemorragia e fosfolipases, bem como a liberação de mediadores endógenos gerados pelos venenos. Considerando que a ativação do sistema complemento (SC) e de funções celulares, como quimiotaxia, ativação, proliferação e citotoxicidade podem desempenhar papel importante nos processos inflamatórios e de lesão tecidual subsequentes ao envenenamento, o estudo propõe: a) investigar a capacidade dos venenos brutos de serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops pirajai* e das toxinas purificadas, serinoprotease de *B. jararacussu* (SPBj) e L-aminoácido oxidase de *B. pirajai* (LAAOBp), em modular a atividade do SC; b) avaliar a contribuição do efeito sobre o SC no recrutamento de leucócitos polimorfonucleares humanos (PMN); c) avaliar o potencial citotóxico direto dos venenos e toxinas sobre células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC); d) analisar o efeito dos venenos sobre a modulação da expressão dos marcadores de ativação CD69, CD25 e HLA-DR em células T, B e natural killer (NK). Os resultados do ensaio de citotoxicidade mostraram que o veneno bruto de *B. jararacussu* foi citotóxico para PBMC apenas nas concentrações maiores, de 50 e 100g/mL, não apresentando citotoxicidade nas outras concentrações testadas. A serinoprotease apresentou baixa citotoxicidade para essas células, o que sugere a necessidade de maiores investigações quanto aos mecanismos que levam a essa morte celular. O aumento da viabilidade celular encontrado nas amostras incubadas com veneno bruto e LAAO de *B. pirajai* sugere possível indução de proliferação celular, que necessita de maiores estudos. Os resultados obtidos sugerem que os venenos brutos de *B. jararacussu* e *B. pirajai* são capazes de ativar o SC como observado nos ensaios cinéticos da VCVL e VA e de quimiotaxia de neutrófilos, onde ficou evidenciado que a migração celular foi devida a liberação dos fatores quimiotáticos do SC, C3a e C5a, e que suas respectivas toxinas, serinoprotease e LAAO apresentam efeitos moduladores sobre o SC humano, e estimulam investigações mais aprofundadas com a finalidade de se esclarecer os mecanismos de ação e identificar os componentes responsáveis pelos efeitos observados. Houve expressão aumentada de CD69, CD25 e HLA-DR nas células T CD4+ e CD8+, especialmente quando incubadas com veneno bruto de *B. jararacussu* e LAAO de *B. pirajai*, o que reflete ativação da resposta imune celular, e pode sugerir que este tipo de resposta desempenhe papel relevante na indução e/ou controle dos processos imunopatológicos decorrentes de envenenamentos por *B. jararacussu* e *B. pirajai*. Esta investigação visa fornecer subsídios para a possível utilização das toxinas para fins terapêuticos e como ferramentas para investigação dos mecanismos envolvidos nos processos fisiopatológicos que ocorrem em decorrência de picadas e também em outras doenças de caráter inflamatório.

**Summary:** Snakes of the genus *Bothrops* are responsible for 90% of snakebites in Brazil. Their venoms cause local effects in humans and animals, such as hemorrhage, edema, pain and necrosis, characteristic of an inflammatory response. The mechanism is not well defined. These effects are related to the combined action of proteases, substances that induce bleeding and phospholipases, as well as release of endogenous mediators generated by the venoms. Considering that activation of the complement system (CS) and cellular functions such as chemotaxis, activation, proliferation and cytotoxicity, may play a role in inflammatory processes and tissue injury following envenomation, the study proposes: a) to investigate the ability of crude venom of *B. jararacussu* and *B. pirajai* and the purified toxins, serineprotease of *B. jararacussu* and L-amino acid oxidase (LAAO) of *B. pirajai* in modulating the activity of

the CS, b) to assess the contribution of the effect on CS in the recruitment of human polymorphonuclear leukocytes (PMN), c) to assess the direct cytotoxic potential of venoms and toxins on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), d) to analyse the effect of venoms on the modulation of the expression of activation markers CD69, CD25 and HLA-DR on T, B and natural killer (NK) cells. The results of cytotoxicity assay showed that the crude venom of *B. jararacussu* was cytotoxic to PBMC only at higher concentrations, 50 and 100g/mL, showing no cytotoxicity in the other concentrations. The serineprotease showed low cytotoxicity to the cells, suggesting the need for further investigations about the mechanisms that lead to this cell death. The increase in cell viability found in samples incubated with crude venom of *B. pirajai* and LAAO suggests the possibility of induction of cell proliferation, which needs further study. The results suggest that the crude venom of *B. jararacussu* and *B. pirajai* are capable of activating the CS as observed in kinetic assays of classical pathwaylectin pathway and alternative pathway and neutrophil chemotaxis assay, where it was shown that cell migration was due to release of CS chemotactic factors, C3a and C5a, and that their respective toxins, serineprotease and LAAO have modulatory effects on human CS, and stimulate further research in order to clarify the mechanisms of action and identify the components responsible for the observed effects. There was increased expression of CD69, CD25 and HLA-DR on CD4+ and CD8+, especially when incubated with crude venom of *B. jararacussu* and LAAO of *B. pirajai*. It reflects activation of cellular immune response and may suggest that this type of response play an important role in the induction and/or control of immunopathological processes arising from envenomation by *B. jararacussu* and *B. pirajai*. This research aims to provide subsidies to the possible use of the toxin for therapeutic purposes and as tools for investigating mechanisms involved in pathophysiological processes that occur as a result of snakebites and also in other diseases of inflammatory nature.

**Comissão:** Luciana Simon Pereira Crott  
Ana Isabel de Assis Pandochi  
Jose Mauricio Sforcin



**Aluno:** Mariana Bryan Augusto

**Orientador:** Sérgio de Albuquerque

**Defesa:** 02/08/2010

**Título:** Avaliação comparativa de diferentes métodos de quantificação de formas teciduais de *Trypanosoma cruzi* na infecção experimental

**Title:** Comparative evaluation of different methodologies in tecidual types quantification of *trypanosoma cruzi*.

**Resumo:** Completando 100 anos da descoberta da moléstia, a Doença de Chagas, causada pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, ainda é considerada nas Américas Central e do Sul um problema de saúde pública, atingindo mais de 8 milhões de indivíduos. Sua transmissão ocorre de distintas maneiras, como por vetores, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes em laboratórios, via oral. O parasita é conhecido por sua heterogeneidade no genótipo e fenótipo, baseado em mutações cumulativas em diferentes sub-populações do parasita. A cepa CL Brener é uma cepa padrão para pesquisa com diversas peculiaridades interessantes como baixa infectividade em animais, resposta aos tratamentos existentes e seus marcadores genéticos serem estáveis. O clone CL B5 de *T. cruzi* é originado a partir da cepa CL Brener modificada geneticamente. A cepa possui um gene repórter, o LacZ de *Escherichia coli* que sintetiza uma enzima, a  $\beta$ -galactose que pode catalisar uma reação colorimétrica com o substrato vermelho de clorofenol  $\beta$ -galactopiranosídeo (CPRG). A atividade enzimática é diretamente proporcional ao número de parasita. No presente trabalho propomos a introdução de uma técnica colorimétrica para caracterização de parâmetros para quantificação do parasitismo tecidual e comparação com a técnica histológica e Real Time-PCR. Camundongos Balb/C machos foram divididos em grupos controle (não infectado) e experimental variando a via de inoculação, a saber, intraperitoneal (IP), subcutânea (SC) e oral (OR). As curvas parasitêmicas foram realizadas por meio da coleta de sangue da cauda do animal. Após morte dos mesmos, foram estudados os tecidos cardíaco, hepático, esplênico, entérico e muscular (músculo esquelético). Os órgãos foram retirados, divididos em três porções equitativas para análise histológica, enzimática e molecular. Na atividade enzimática, comparando os tecidos em suas vias de inoculação, o fígado apresentou resultado significativo no grupo inoculado via IP. Tecido cardíaco apresentou diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre as vias de inoculação OR e SC, apresentando maior atividade enzimática na primeira, o que está relacionado a uma maior quantidade de parasita tecidual. Nos cortes histológicos o grupo SC mostrou-se mais infectado com grande número de ninhos de forma amastigota em praticamente todos os tecidos, enquanto nos demais grupos foram observados ninhos de amastigota em sua maioria no coração e músculo esquelético. A presença do parasita nos demais tecidos foi confirmada pela eletroforese em gel de agarose 1,5% após técnica de PCR convencional. A Real Time-PCR não se mostrou satisfatória no trabalho devido a dificuldade na sua padronização. Concluindo, a metodologia enzimática se mostrou favorável e adequada na quantificação parasitária tecidual, podendo ser aperfeiçoada para corroborar sua eficácia.

**Summary:** One hundred years after the discovery of Chagas' Disease, an illness caused by blood born protozoan *Trypanosoma cruzi*, is still consider a public health problem. It is a major cause of morbidity and mortality in Central and South Americas where more than 8 million individuals are already infected. This illness can be contracted by different forms as vector transmission, blood transfusion, tissue transplant, laboratory accidents and oral route. The parasite has a heterogeneous genotype and phenotype due to accumulating mutation in their sub-populations. CL Brener is considered as a pattern strain due to some intrinsic characteristics as low infectivity, good response to therapy drugs and a stable genetic heritage. The CL B5 clone of *T. cruzi* was originated by a genetic modification of the CL Brener strain which has a reporter gene LacZ of *Escherichia coli*, which induces the syntesis of  $\beta$ -galactosidase which is able to catalyze a colorimetric reaction using the substrat Chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG). The enzymatic activity is directly related with the number of the parasites. In this study we proposed a new colorimetric assay to quantify *T. cruzi* load in different animal tissues by comparing with other methodologies such histological and molecular assay (Real Time-PCR). Male Balb/C mice were separated into control and

experimental groups according to the route of infection (IP-intraperitoneal, SC-subcutaneous, OR-oral). Parasitemic curves were made by collecting blood samples from the tail of experimental animals. Fifteen days after, animals were euthanized and their tissues removed (heart, liver, spleen, intestine and skeletal muscles) and divided in three portions for the colorimetric analyses, histopathology and molecular assay. The enzymatic activity was performed comparing the number of parasites in different tissues according to the route of infection. Comparing them, it was observed that heart and liver displayed the highest number of parasites as compared with the other studied tissues. In the liver, IP route triggered the highest number of parasites while in the heart OR and SC routes displayed enhanced parasites. The histopathology analysis revealed that SC group presented the highest number of amastigote nests. For IP and OR groups, nests were mostly observed in heart and skeletal muscles. *T. cruzi* DNA were detected using electrophoreses 1,5 % agarose gel after conventional PCR technique, displaying characteristic bands of DNA. The Real Time-PCR was not a satisfactory assay for this study due to difficulties on its patronization. To conclude, the enzymatic methodology was advantageous and appropriated on quantifying tissue parasites. Some further experiments will be needed to improve methodology and its efficacy.

**Comissão:** Sérgio de Albuquerque  
Ana Amelia Carraro Abrahão  
Silmara Marques Allegretti

**Aluno:** Thalita Bachelli Riul

**Orientador:** Marcelo Dias Baruffi

**Defesa:** 11/06/2010

**Título:** Avaliação da participação da galectina-1 na evolução da infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi*

**Title:** Impact of galectin-1 on the evolution of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection

**Resumo:** A galectina-1 (Gal-1) é uma proteína que reconhece -galactosídeos e participa de vários processos biológicos, incluindo a modulação da resposta imunológica. Vários relatos da literatura reportam o potencial uso terapêutico da Gal-1 para doenças auto-imunes, inflamatórias, degenerativas e infecciosas. Entretanto, são escassos os relatos sobre o envolvimento da Gal-1 na doença causada por *Trypanosoma cruzi*. O presente trabalho tem como objetivos o estudo da participação da Gal-1 endógena e exógena na evolução da infecção aguda experimental por *T. cruzi*. Galectina-1 recombinante, camundongos C57BL/6 deficientes (nocaute - Gal-1<sup>-/-</sup>) ou não (selvagem - Gal-1<sup>+/+</sup>) do gene da galectina-1 e macrófagos desses animais foram utilizados em experimentos de infecção in vivo e/ou in vitro. Os animais foram infectados com tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Y, por via intraperitoneal. Os parâmetros analisados na caracterização do processo de infecção foram: parasitemia e sobrevivência; histopatologia do tecido cardíaco; dosagem de óxido nítrico, pelo método de Griess; imunofenotipagem de leucócitos, por citometria de fluxo; dosagem de citocinas por ELISA e taxa de liberação de parasitas em cultura de macrófagos. Os camundongos Gal-1<sup>-/-</sup> ou Gal-1<sup>+/+</sup> tratados com Gal-1 exógena apresentaram as menores taxas de parasitemia. De modo interessante, todos os camundongos Gal-1<sup>-/-</sup> sobreviveram à infecção, enquanto que os selvagens apresentaram uma drástica redução de sobrevivência após o desafio com *T. cruzi*. A ausência da Gal-1 endógena ou o tratamento com a Gal-1 exógena provocou no músculo cardíaco de camundongos infectados uma significativa redução infiltrado inflamatório. As dosagens de citocinas séricas indicaram que animais selvagens infectados e tratados com Gal-1 apresentaram uma diminuição de IFN- em relação aos não tratados. Além disso, soros de animais nocautes infectados apresentaram níveis inferiores de diferentes citocinas (TNF-, IFN-, IL-4, IL-10 e IL-12) em comparação com amostras séricas de animais selvagens infectados. As porcentagens de diferentes tipos de células esplênicas (T, B, macrófagos, NKT e NK) foram, geralmente, maiores em camundongos selvagens do que em nocautes após a infecção por *T. cruzi*. Curiosamente, na cavidade peritoneal de camundongos Gal-1<sup>-/-</sup> ocorreu um aumento de neutrófilos e macrófagos após 12h ou 24h da infecção, respectivamente. O pico de produção de NO induzido por *T. cruzi* em macrófagos Gal-1<sup>-/-</sup> foi mais precoce e intenso do que o obtido por macrófagos Gal-1<sup>+/+</sup>. Além disso, os macrófagos Gal-1<sup>-/-</sup> liberaram menos parasitas in vitro em comparação como os macrófagos Gal-1<sup>+/+</sup>. Com base nesse conjunto de resultados sugerimos que a ausência de Gal-1 endógena ou o tratamento de animais com Gal-1 exógena promoveram perfis imunológicos (resposta inata e adaptativa) favorecedores da resolução da infecção experimental aguda por *T. cruzi*.

**Summary:** Galectin-1 (Gal-1) is a -galactoside-binding protein and participates in several biological processes, including modulation of immune response. In the literature, there are several reports about the potential therapeutic use of Gal-1 for autoimmune diseases, inflammatory, degenerative and infectious diseases. However, there are few reports on the involvement of Gal-1 in disease caused by *Trypanosoma cruzi*. Thus, this work was conducted to study the participation of endogenous and exogenous Gal-1 in acute experimental infection by *T. cruzi*. Recombinant Gal-1, galectin-1-deficient mice (KO - Gal-1<sup>-/-</sup>) or wild type (WT - Gal-1<sup>+/+</sup>) mice and macrophages from these animals were used to perform the in vivo and in vitro assays. The animals were infected with trypomastigotes of *T. cruzi* (strain Y), intraperitoneally. The biological parameters analyzed were parasitemia and survival; histopathology of heart tissue, measurement of nitric oxide by Griess reaction; leukocyte immunophenotyping by flow cytometry; cytokine detection by ELISA and the release rate of

parasites in cultured macrophages. Infected-Gal-1<sup>-/-</sup> mice or infected-Gal-1<sup>+/+</sup> mice treated with Gal-1 showed the lowest levels of parasitemia. Interestingly, all infected-KO mice survived after the infection, whereas the infected-WT mice showed a drastic reduction in survival. The absence of endogenous Gal-1 or the exogenous Gal-1 treatment promoted a drastic reduction on inflammatory cells infiltrate in the cardiac muscle of infected mice. The sera of infected-WT mice treated with Gal-1, but not untreated animals, showed high levels of IFN- $\gamma$ . Additionally, sera from infected-KO mice showed lower levels of different cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 and IL-12) compared with serum samples from infected-WT animals. The number of spleen cells (T, B cells, macrophages, NK and NKT) were generally higher in WT mice than in KO mice after infection with *T. cruzi*. Interestingly, the peritoneal cavity of infected-KO mice presented an increased numbers of neutrophils and macrophages after 12h or 24h of infection, respectively. The peak of NO production induced by *T. cruzi* in Gal-1<sup>-/-</sup> macrophages was earlier and more intense than that obtained by Gal-1<sup>+/+</sup> macrophage. Furthermore, Gal-1<sup>-/-</sup> macrophage released fewer parasites in vitro in comparison to Gal-1<sup>+/+</sup> macrophages. Taken together, these results suggest that the absence of endogenous Gal-1 or treatment with exogenous Gal-1 promoted immunological profiles (innate and adaptative responses) that cooperate to the resolution of acute experimental infection by *T. cruzi*.

**Comissão:** Marcelo Dias Baruffi  
Vania Luiza Deperon Bonato Martins  
Alexandra Ivo de Medeiros

**Aluno:** **Fernanda Barbosa dos Reis**

**Orientador:** Elaine Cristina Pereira De Martinis

**Defesa:** 26/02/2010

**Título:** Bioconservação de pescado (surubim *Pseudoplatystoma* sp) com utilização da bactéria láctica bacteriocinogênica (*Carnobacterium maltaromaticum* C2) e de extratos vegetais de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)

**Title:** Biopreservation of fish (surubim *Pseudoplatystoma* sp.) with the use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria (*Carnobacterium maltaromaticum* C2) and hidroalcoholic extracts of alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.)

**Resumo:** Alimentos minimamente processados refrigerados prontos para o consumo podem veicular a bactéria *Listeria monocytogenes*, causadora de infecções graves principalmente em pessoas imunocomprometidas e mulheres grávidas. A aplicação de tratamentos combinados em alimentos é uma alternativa promissora para inibição efetiva de *L. monocytogenes* e, neste sentido, no presente trabalho foi estudado efeito inibitório de preparações de alecrim pimenta e de bactérias lácticas. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) de preparações líquidas e secas de alecrim pimenta, em diferentes temperaturas, combinadas ou não com linhagens da bactéria láctica *C. maltaromaticum* (C2, A9b- e A9b+). O uso combinado de culturas de *C. maltaromaticum* produtoras (C2, A9b+) e não produtora de bacteriocina (A9b-) com ou sem EAP (extrato hidroalcoólico de alecrim pimenta) frente a *L. monocytogenes* também foi determinado em sistemas de pescado (caldo de peixe modelo, caldo de surubim e homogeneizado de surubim) mantidos a 5°C por 35 dias. Os resultados de CIM de EAP frente a *L. monocytogenes* foram de 1,34µl/ml e 0,89µl/ml, respectivamente a 37°C e 5°C, mostrando que houve sinergismo entre EAP e temperatura de refrigeração. Dentre as preparações de alecrim pimenta testadas, EAP apresentou a maior atividade antilisteriana, mas também inibiu as carnobactérias. Não ocorreu sinergismo de EAP combinado com a bacteriocina de *C. maltaromaticum* C2. Em experimentos de co-inoculação em modelos de pescados, as monoculturas de *L. monocytogenes* e de *C. maltaromaticum* (C2, A9b+ e A9b-) alcançaram populações finais entre 106-108 UFC/ml. Em caldo de peixe modelo, EAP sozinho e combinado com culturas de *C. maltaromaticum* (C2 ou A9b- ou A9b+) apresentou efeito inibitório frente *L. monocytogenes*. Contudo, *C. maltaromaticum* (C2 ou A9b- ou A9b+) sem EAP causou pequena inibição de *L. monocytogenes*. Em caldo de surubim, *C. maltaromaticum* C2 foi a bactéria láctica mais eficiente para inibir *L. monocytogenes* e houve produção de bacteriocina. Em homogeneizado de surubim com alto nível de inoculação, EAP sozinho e combinado com culturas de *C. maltaromaticum* (A9b- ou A9b+) apresentou maior efeito inibitório frente *L. monocytogenes*, enquanto que *C. maltaromaticum* C2 com EAP inibiu transitariamente *L. monocytogenes*, que atingiu população final de aproximadamente 106 UFC/ml. *C. maltaromaticum* C2 ou A9b- inoculados em homogeneizado de surubim com alto nível de inoculação e sem EAP reduziram 3 log de UFC/ml de *L. monocytogenes*, mas na mesma condição foi observada a inibição de apenas 1 log de UFC/ml para *C. maltaromaticum* A9b+. Em homogeneizado de surubim com baixas populações iniciais de *L. monocytogenes* (<10 UFC/ml) foi observado que EAP sozinho e combinado com culturas de *C. maltaromaticum* (C2 ou A9b- ou A9b+) apresentou efeito anilisteriano. Entretanto, *C. maltaromaticum* (C2 ou A9b- ou A9b+) sem EAP não inibiu *L. monocytogenes*. Foi observado que o uso de EAP e de culturas de carnobactérias tem potencial para inibir *L. monocytogenes* em pescados e que as aplicações devem ser estudadas cuidadosamente, considerando a influência da matriz alimentícia.

**Summary:** Minimally processed ready-to-eat foods may be contaminated with *Listeria monocytogenes*, which causes severe infection mainly in immunocompromised persons and in pregnant women. The application of combined treatments in foods is a promising alternative for the effective inhibition of *L. monocytogenes* and, in this work, the inhibitory effect of alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) and lactic acid bacteria was studied. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of liquid and dried preparations of alecrim pimenta was determined in different temperatures, combined or not with strains of *Carnobacterium maltaromaticum* (C2, A9b- and A9b+). The combined use of cultures of *C. maltaromaticum*

bacteriocin-producing (C2 and A9b+) and non bacteriocin-producing (A9b-) with or without EAP (hydroalcoholic extract of alecrim pimenta) towards *L. monocytogenes* was also determined in model fish systems (fish model broth, surubim fish broth and surubim homogenate, at 5°C for 35 days. The results of MICs of EAP against *L. monocytogenes* were 1.34 µl/ml and 0.89 µl/ml, respectively at 37°C and 5°C, indicating synergistic effect between EAP and low temperature. Among the preparations of alecrim pimenta tested, EAP showed the highest antilisterial activity, but it also inhibited carnobacteria. No synergistic effect of EAP combined with bacteriocin of *C. maltaromaticum* C2 was observed. In co-inoculation studies in model fish systems, monocultures of *L. monocytogenes* and *C. maltaromaticum* (C2, A9b+ and A9b-) reached final populations of 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> CFU/ml. In fish model broth, EAP alone and combined with cultures of *C. maltaromaticum* (C2- or A9b- or A9b+) presented inhibitory effect against *L. monocytogenes*. However, *C. maltaromaticum* (C2 or A9b- or A9b+) without EAP caused weak inhibition of *L. monocytogenes*. In surubim fish broth, *C. maltaromaticum* C2 was the most efficient culture for inhibiting *L. monocytogenes* and bacteriocin was produced. In surubim homogenate with high inoculation level, EAP alone and combined with cultures of *C. maltaromaticum* (A9b- or A9b+) presented stronger inhibitory effect towards *L. monocytogenes*, while *C. maltaromaticum* C2 with EAP caused only initial inhibition of *L. monocytogenes*, that reached final population of ca. 10<sup>6</sup> CFU/ml. *C. maltaromaticum* C2 or A9b- inoculated in surubim homogenate with high inoculation level without EAP reduced 3 log of CFU/ml of *L. monocytogenes*, but in the same condition it was observed only the reduction of 1 log of CFU/ml for *C. maltaromaticum* A9b+. In surubim homogenate with low initial populations of *L. monocytogenes* (<10 CFU/ml) it was observed that EAP alone and combined with co-cultures of *C. maltaromaticum* (C2 or A9b- or A9b+) presented antilisterial effect. However, *C. maltaromaticum* (C2 or A9b- or A9b+) without EAP did not inhibit *L. monocytogenes*. It was observed that the use of EAP and cultures of carnobacteria have potential to inhibit *L. monocytogenes* in fish and that the applications should be carefully studied, considering the influence of food matrix.

**Comissão:** Elaine Cristina Pereira de Martinis  
Juliana Pfrimer Falcão  
Judite das Gracas Lapa Guimarães

**Aluno:** Thalita Freitas Martins

**Orientador:** Maria José Alves da Rocha

**Defesa:** 11/01/2010

**Título:** Efeito do MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos, na produção de óxido nítrico e na liberação de vasopressina durante sepse experimental.

**Title:** Effect of MK-886, a LTs synthesis inhibitor, in oxide nitric production and vasopressin release during experimental sepsis.

**Resumo:** Evidências sugerem que os leucotrienos (LTs) e óxido nítrico (NO) podem apresentar um papel na liberação de vasopressina (AVP) que ocorre durante a fase inicial da sepse. Além disso, é conhecido que os LTs afetam a produção de NO. Nosso objetivo foi analisar o efeito do MK-886, um inibidor da síntese de LTs, na produção de NO e na liberação de AVP durante sepse experimental. Ratos Wistar receberam injeções i.p. de MK-886 (1.0, 2.0 ou 4.0mg/kg) ou veículo (DMSO 5%) 1h antes da ligadura e perfuração cecal (CLP) ou operação fictícia. Em um grupo a taxa de sobrevivida foi monitorada durante 3 dias. Em outro grupo, os animais foram decapitados em 0, 4 e 24h após CLP ou operação fictícia, e o sangue foi coletado para a determinação da osmolalidade, sódio sérico, hematócrito, proteínas plasmáticas, nitrato sérico e cis-LTs e AVP plasmáticos. Além disso, foi avaliado o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos ratos. O CLP aumentou os níveis de nitrato sérico, perda de proteínas, hematócrito e AVP plasmática 4h após a cirurgia, além disso, causou uma mortalidade de 80% após 3 dias de observação. Os níveis de sódio sérico e a osmolalidade apresentaram reduções pequenas, enquanto os níveis de cis-LTs e o recrutamento de neutrófilos permaneceram inalterados. O pré-tratamento com qualquer concentração de MK-886 não diminuiu a produção de nitrato sérico, a perda de proteínas plasmáticas e o hematócrito. Além disso, não alterou os níveis de sódio sérico, osmolalidade, cis-LTs plasmáticos, o recrutamento de neutrófilos e a taxa de sobrevivida. Porém, a liberação de AVP foi afetada de uma maneira dose-dependente na fase inicial da sepse. Na fase tardia, a AVP plasmática se manteve em concentrações basais e a administração de MK-886 não alterou essas concentrações. Os resultados sugerem que o MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos, pode afetar a liberação de vasopressina na fase inicial da sepse e esse efeito parece ser independente da produção de óxido nítrico.

**Summary:** Evidence suggests that leukotrienes (LTs) and nitric oxide (NO) may have a role in vasopressin (AVP) release that occurs during the early phase of sepsis. Moreover, LTs are thought to affect NO production. Our objective was to analyze the effect of MK-886, a LTs synthesis inhibitor, on NO production and AVP release. Male Wistar rats received i.p. injections of MK-886 (1.0, 2.0 or 4.0mg/kg) or vehicle (DMSO 5%) 1h before cecal ligation and puncture (CLP) or sham operation. In one group the survival rate was monitored for 3 days. In another group, the animals were decapitated at 0, 4 and 24h after CLP or sham operation, and blood was collected for osmolality, serum sodium, hematocrit, plasma protein, serum nitrate and plasma cys-LTs and AVP levels measurement. Moreover, was evaluated neutrophil recruitment into the peritoneal cavities of rat. CLP increased serum nitrate levels, protein leakage, hematocrit, plasma AVP 4h after CLP, besides causing 80% mortality after 3 days of observation. The serum sodium levels and osmolality presented small reduction, while cys-LT levels and neutrophil recruitment remained unchanged. Pretreatment with any dose of MK-886 did not diminish nitrate production, protein leakage and hematocrit. Besides, not did it alter serum sodium levels, osmolality, plasma cys-LT levels and neutrophil recruitment. It also did not affect survival rate. AVP release was, however, affected in a dose-dependent manner in the early phase of sepsis. In the final phase of sepsis, plasma AVP levels remained basal and the administration of MK-886 did not alter these hormone levels. The results suggest that the MK-886, a LTs synthesis inhibitor, may affect the release of vasopressin in the early phase of sepsis and that this effect seems to be independent of nitric oxide production.

**Comissão:** Maria José Alves da Rocha  
Auro Nomizo  
Alexandra Ivo de Medeiros