



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

MESTRADO – 2011

Aluno: Bianca Stocco

Orientador: Maria Regina Torqueti

Defesa: 26/09/2011

Título: Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre a hemostasia.

Title: Evaluation of the effect of hormonal contraceptives on hemostasis

Título: Evaluación del efecto de los anticonceptivos hormonales sobre la hemostasia

Resumo: Mais de 100 milhões de mulheres no mundo fazem uso de métodos contraceptivos hormonais. Apesar de seu desejado efeito na contracepção, sua metabolização ocorre no fígado estimulando a síntese de proteínas plasmáticas, dentre elas, as que controlam os sistemas de coagulação e fibrinólise, conferindo um estado de hipercoagulabilidade em suas usuárias. A literatura aponta também alterações no metabolismo dos lipídios e carboidratos, além de modular a expressão de moléculas de adesão presentes no endotélio. Para combater os efeitos indesejáveis destes medicamentos, baixas concentrações de estrógenos e diferentes progestágenos foram introduzidos, pois, a estes últimos é conferida a atividade anti – estrogênica destas formulações. Estudos independentes sugerem que progesteronas de terceira e quarta geração possuem atividade anti-estrogênica menor em relação as de segunda geração. Objetivos: avaliar a ocorrência de alterações hemostáticas, analisar o perfil lipídico e quantificar moléculas de adesão no soro ou plasma da população feminina brasileira usuária de contraceptivos orais de segunda e quarta gerações. Materiais e Métodos: 70 participantes distribuídas em quatro grupos a saber : grupo I (controle- 20 pacientes); grupo II (DRSP/30EE- 20 pacientes); grupo III (DRSP/20EE- 16 pacientes) e grupo IV (LNG/30EE-14 pacientes). Foram avaliados os seguintes parâmetros: TP, Fator VII, TTPA, Fator XII, Fibrinogênio, Fator 1+2, Proteína C, Proteína S, Antitrombina, D – dímeros, PAI – 1, VCAM, ICAM, E- selectina, HDL, LDL,VLDL, Colesterol total e Triglicérides. Resultados e discussões: grupo II promoveu diminuição em TP e Prot. S; e aumento em HDL,VLDL,Col. total e TG; grupo III diminuiu TP, TTPA, Prot.S, ICAM e VCAM ; e aumentou Fibrinogênio, D-dímeros, HDL,VLDL,Col. total e TG e grupo IV diminuiu TP, Prot.C e aumentou ICAM e VCAM. Conclusões: Dos medicamentos estudadosapontamos que: o grupo II promoveu alterações significativas no perfil lipídico caracterizando um estado pró-trombótico, apesar de apresentar o maior aumento nos valores de HDL e poucas alterações associadas à hipercoagulabilidade; o grupo III promoveu o maior número de alterações hipercoagulantes, alterou também perfil lipídico contribuindo para um estado pró- trombótico, embora tenha apresentado proteção endotelial e o grupo IV foi o medicamento que promoveu melhor proteção endotelial, não alterou perfil lipídico e ocasionou poucas alterações associadas à hipercoagulabilidade.

Summary: More than 100 million women in the world make use of hormonal contraceptives. In spite of its desired effect on contraception, its metabolization occurs at liver, stimulating the synthesis of the plasmatic proteins, among them, the ones that control the coagulation system and fibrinolysis, conferring a hypercoagulability state in their users.The literature also points changes in the metabolism of lipids and carbohydrates, besides modulate the expression of adhesion molecules present in the endothelium. Trying to combat undesirable effects of these drugs, low concentrations of estrogen and different progestogens were introduced, because, the antiestrogenic activity of these drugs is assigned to the progesterone used. Independent papers suggest that third and fourth generation

progesterones have a smaller antiestrogenic activity in relation to the second generation one. Objectives: evaluate the occurrence of hemostatic alterations, analyze the lipid profile and quantify adhesion molecules in serum or plasma on the Brazilian female population who is user of contraceptives from second and fourth generation. Material and Methods: 70 participants were distributed into four groups: group I (control- 20 patients); group II (DRSP/30EE- 20 patients); group III (DRSP/20EE- 16 patients) and group IV (LNG/30EE- 14 patients). From these were assessed the following parameters: PT, Factor VII, APTT, Factor XII, Fibrinogen, Factor 1+2, Protein C, Protein S, Antithrombin, D-dimers, PAI - 1, VCAM, ICAM, Eselectin, HDL, LDL, VLDL, Total Cholesterol and Triglycerides. Results and discussion: group II promoted a decrease in PT and Prot.S; and an increase in HDL, VLDL, Total cholesterol and TG; group III decreased PT, APTT, Prot.S, ICAM and VCAM ; and increased Fibrinogen, D- dimers, HDL, VLDL, Total Cholesterol and TG and group IV decreased PT, Prot.C and increased ICAM and VCAM. Conclusions: among the drugs studied we aim that: the group II promoted significant changes in lipid profile featuring a prothrombotic state, in spite of presented the highest increase in the levels of HDL and few alterations associated to hypercoagulability; group III promoted the biggest number of hypercoagulability alterations, this drug also changed the lipid profile contributing to a prothrombotic state, although it has presented endothelial protection and the group IV it was the drug that promoted the Best endothelial protection, did not change lipid profile and caused few alterations associated with hypercoagulability.

Resumen: Más de 100 millones de mujeres en todo el mundo hacen uso de los anticonceptivos hormonales. A pesar de su efecto deseado sobre la anticoncepción, su metabolismo en el hígado y estimula la síntesis de las proteínas del plasma, entre ellos, los sistemas que controlan la coagulación y la fibrinólisis, que confiere un estado de hipercoagulabilidad en sus usuarios. La literatura también apunta a cambios en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, y modular la expresión de moléculas de adhesión presentes en el endotelio. Para combatir los efectos indeseables de estos medicamentos, las concentraciones bajas de estrógenos y progestinas han sido introducidas diferente, porque esta última actividad se confiere anti - estrógeno en estas formulaciones. Estudios independientes sugieren que la progesterona tercera y cuarta generación actividad antiestrogénica son inferiores a los de la segunda generación. Objetivos: Evaluar la incidencia de los cambios de la hemostasia, analizar el perfil lipídico y cuantificar moléculas de adhesión en suero o plasma de las mujeres usuarias de anticonceptivos orales de Brasil en la segunda y cuarta. Materiales y métodos: 70 participantes se dividieron en cuatro grupos: grupo I (control de 20 pacientes), grupo II (DRSP/30EE- 20 pacientes), grupo III (DRSP/20EE- 16 pacientes) y grupo IV (LNG/30EE -14 pacientes). Se evaluaron los siguientes parámetros: PT, Factor VII, APTT, factor XII, el fibrinógeno, el factor 1 +2, la proteína C, proteína S, antitrombina, D - dímero, PAI - 1, VCAM, ICAM, la E-selectina, HDL, LDL , el colesterol VLDL, total y triglicéridos. Resultados y discusión: Grupo II provocó una reducción de mano de obra y Prot. S, y El aumento de HDL, VLDL, Col. TG y el total del grupo III disminuyó PT, APTT, Prot.S, ICAM y VCAM, y el aumento de fibrinógeno, D-dímeros, HDL, VLDL, Col. Total de Grupo IV y los triglicéridos y disminución del TP, Prot.C y el aumento de ICAM y VCAM. Conclusiones: De los medicamentos estudiados señaló que: el grupo II promovió cambios significativos en el perfil lipídico con un estado protrombótico, a pesar de tener el mayor aumento en HDL y algunos cambios relacionados con la hipercoagulabilidad y el grupo III, promovió el mayor número de cambios hipercoagulabilidad, perfil lipídico alterado también contribuye a un estado protrombótico, a pesar de que tenía la protección endotelial y el grupo IV fue el fármaco que promueve una mejor protección endotelial, no alteró el perfil de lípidos y ha causado pocos cambios asociados con hipercoagulabilidad.

Comissão: Maria Regina Torqueti
Cristina Ribeiro de Barros Cardoso
Rogério Bonassi Machado

Aluno: Helen Figueiredo Fumagalli

Orientador: Maria Regina Torqueti

Defesa: 20/09/2011

Título: Avaliação do efeito do extrato de soja (*Glycine max*) biotransformado pelo fungo *Aspergillus awamori* em cultura de células de câncer de mama estrógeno-dependente e independente.

Title: Effect of Soy Extract (*Glycine max*) biotransformed by the fungus *Aspergillus awamori* in cultured breast cancer cells estrogendependent and independent

Título: Efecto del extracto de soja (*Glycine max*) biotransforma por el hongo *Aspergillus awamori* en cultivos de células de câncer de mama estrógeno-dependientes e independientes.

Resumo: Isoflavonóides são compostos encontrados em vários vegetais e apresentam diversos efeitos farmacológicos. Dentre estes compostos, encontramos os fitoestrógenos, assim chamados por possuírem ações que mimetizam o efeito do estrógeno natural sobre as células. A soja (*Glycine max*), um dos vegetais ricos nos fitoestrógenos daidzeína e genisteína, tem sido indicada pela literatura como terapia alternativa para a menopausa pela atividade estrogênica que apresenta, visto que a terapia estroprogestiva para tratar os sintomas desta fase aponta um aumento da incidência de câncer de mama. Objetivo: Avaliar a promoção de apoptose e/ou necrose por um Extrato de Soja (*Glycine max*) Biotransformado pelo fungo *Aspergillus awamori* (ESBF) em células de linhagem de adenocarcinoma mamário estrógeno-dependentes (MCF-7) e estrógeno-independentes (SK-BR-3). Materiais e métodos: o ESBF foi produzido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), com concentração determinada de daidzeína (D) e genisteína (G) por CLAE e avaliado em dois modelos de células de adenocarcinoma mamário: estrógeno-dependentes (MCF-7) e estrógeno-independentes (SK-BR-3). Nestes modelos experimentais, foram avaliados também, o Extrato de Soja (ES) e os padrões comerciais de daidzeína (D) e genisteína (G) isoladas ou em combinação (D+G). Neste estudo avaliamos estes compostos perante os parâmetros: a) citotoxicidade pelo método de MTT; b) necrose e apoptose celular pelo ensaio de marcação por iodeto de propídio (IP) e anexina-V e IP; c) a atividade da caspase-3 por western blotting. Resultados: o ESBF nas linhagem MCF-7 e SKBR-3 apresentou citotoxicidade dose-dependente a partir de 2,184 mg/mL; o ES apresentou aumento na viabilidade celular em todas as concentrações estudadas; os padrões D e G nas concentrações 1,3 e 1,5 μ M respectivamente aumentou a viabilidade celular apenas para a linhagem MCF-7; resultado este não observado nas células SK-BR-3. Quanto aos ensaios de necrose e apoptose, encontramos que as duas linhagens celulares apresentaram marcação pelo IP a partir da concentração de 1,638 mg/mL do ESBF, enquanto que o ES e D+G não apresentaram marcação nas concentrações testadas. Somente para a linhagem MCF-7 encontramos no teste de anexina-V + IP apoptose precoce a partir da concentração 0,819 mg/mL e apoptose tardia/necrose a partir da concentração de 2,717 mg/mL frente ao ESBF, enquanto que frente ao ES e aos padrões D+G este resultado não foi observado. Utilizando apenas a linhagem MCF-7, com relação a detecção da caspase-3 íntegra, não foi possível visualizar sua presença a partir da concentração de 1,638 mg/mL do ESBF. Conclusão: Com este estudo verificamos que o ESBF favorece a indução a morte celular das linhagens MCF-7 e SK-BR-3, não acontecendo o mesmo com o ES e os padrões D+G. Nossos achados sugerem que componentes do fungo são os responsáveis por este efeito biológico, e não os metabólitos da soja, visto que os padrões de daidzeína e genisteína, bem como o ES, não apresentaram os resultados de morte celular evidenciados aqui.

Summary: Isoflavones are compounds found in various vegetables and have different pharmacological effects. Among these compounds there are phytoestrogens, so called because they have actions that mimic the effects of natural estrogen on cells. Soybean (*Glycine max*), a plant rich in phytoestrogens genistein and daidzein, have been cited in the literature as an alternative therapy for menopause because this plant has estrogen activity. Since oestroprogestative therapy to treat the symptoms of this phase, has many collateral effects, like increased incidence of breast cancer. Objective: To evaluate the promotion of apoptosis

and/or necrosis caused by an extract of soybean (*Glycine max*) biotransformed by the fungus *Aspergillus awamori* (ESBF) by cell lineage of estrogen-dependent (MCF-7) and estrogen-independent (SK-BR-3) breast adenocarcinoma. Materials and methods: ESBF was produced at the Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto (FCFRP / USP), with known concentration of daidzein (D) and genistein (G) by HPLC and subjected to two models of breast adenocarcinoma cells: estrogen- dependent (MCF-7) and estrogenindependent (SK-BR-3). In these experimental models were also evaluated, Soy Extract (ES) and the commercial standards of daidzein (D) and genistein (G) alone or in combination (D+G). In this study we evaluated all these compounds the following parameters: a) cytotoxicity by MTT method; b) necrosis and apoptosis assay by dialing propidium iodide (PI) and annexin-V + PI; c) the activity of caspase-3 by western blotting. Results: ESBF in cell line MCF-7 and SK-BR-3 showed dosedependent cytotoxicity starting from 2.184 mg/mL, the ES showed an increase in cell viability at all concentrations studied, D and G standards at concentrations of 1, 3 and 1.5 mM respectively increased cell viability only in line MCF-7, this result not observed in SK-BR-3. For the tests of necrosis and apoptosis, we found that that two cell lines presented labeling IP from the concentration of 1.638 mg/mL of ESBF, while the ES and D + G showed no labeling at all concentrations tested. Only line MCF-7 in the test of annexin-V + PI early apoptosis from the concentration 0.819 mg/mL and late apoptosis or necrosis from the concentration of 2.717 mg / mL against the ESBF, while facing the ES and D+G standards this result was not observed. Using only the cell line MCF-7 in assay to detection of caspase-3 intact, we could not see his presence from the concentration of 1.638 mg/mL ESBF. Conclusion: This study verified that the ESBF favors the induction of cell death in cell line MCF-7 and SK-BR-3, the same not happening with the ES and D+G standards. Our findings suggest that components of the fungus are responsible for this biological effect and not the soy metabolites, since the standards of daidzein and genistein, as well as the ES, the results showed no cell death.

Resumen: Las isoflavonas son compuestos que se encuentran en los vegetales distintas y tienen diferentes efectos farmacológicos. Entre estos compuestos, los fitoestrógenos encontrados, llamados así porque tienen acciones que imitan los efectos del estrógeno natural en las células. De soja (*Glycine max*), una planta rica en fitoestrógenos genisteína y daidzeína, se ha indicado en la literatura como una terapia alternativa para la menopausia de la actividad del estrógeno, que desde entonces la terapia oestrogenativa para tratar los síntomas de esta fase indica un aumento en la incidencia cáncer de mama. Objetivo: Evaluar la promoción de la apoptosis y/o necrosis causada por un extracto de soja (*Glycine max*) biotransformado por el hongo *Aspergillus awamori* (ESBF) linaje de células de adenocarcinoma de mama estrógeno-dependientes (MCF-7) y estrógeno-independientes (SK-BR-3). Material y métodos: ESBF se produjo en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP), con especial concentración de daidzeína (D) y la genisteína (G) por HPLC y se evaluó en dos modelos de células de adenocarcinoma de mama: los estrógenos-dependiente (MCF-7) e estrógenos-independientes (SKBR-3). En estos modelos experimentales se evaluaron, extracto de soja (ES) y las normas comerciales de la daidzeína (D) y la genisteína (G) solo o en combinación (D + G). Se evaluaron estos compuestos antes de los parámetros: a) citotóxica por el método MTT; b) ensayo de la necrosis y la apoptosis mediante la marcación de yoduro de propidio (PI) y la anexina V y IP; c) la actividad de la caspasa-3 por Western Blotting. Resultados: ESBF en las células MCF-7 y SK-BR-3 mostraron citotoxicidad dependiente de la dosis inicial de 2,184 mg/mL, el ES mostraron un aumento de la viabilidad celular en todas las concentraciones estudiadas; los modelos D y G, en concentraciones de 1,3 y 1,5 mM, respectivamente, aumentó la viabilidad celular sólo para las células MCF-7, un resultado que no se ve en las células SK-BR-3. Para las pruebas de la necrosis y la apoptosis, se encontró que las dos líneas celulares presentaron IP etiquetado de la concentración de 1.638 mg/mL ESBF, mientras que el ES y D + G no mostró ninguna marca a las concentraciones ensayadas. Sólo la cepa MCF-7 en test anexina V + PI hallada principios de la apoptosis en la concentración de 0.819 mg/mL y finales de apoptosis/necrosis de la concentración de 2,717 mg/mL contra la ESBF, mientras que frente a la ES y D + G normas que este resultado no se observó. Utilizando únicamente la línea MCF-7, con respecto a la detección de caspasa-3 completo, no podía ver su presencia en la concentración de 1,638 mg/mL ESBF. Conclusión: Este estudio verificó que la ESBF favorece la inducción de las líneas de la muerte celular MCF-7 y SK-BR-3, lo mismo no sucede con el ES y el estándar de D & G. Nuestros hallazgos sugieren que los

componentes de los hongos son los responsables de este efecto biológico no, los metabolitos de la soja, ya que las normas de la daidzeína y la genisteína, así como la ES, los resultados no mostraron evidencia aquí la muerte celular.

Comissão: Maria Regina Torqueti
Christiane Pienna Soares
Auro Nomizo

Aluno: **Fabício Luiz Tulini**

Orientador: Elaine Cristina Pereira De Martinis

Defesa: 09/08/2011

Título: Caracterização de bacteriocinas produzidas por *Carnobacterium maltaromaticum* C2, isolado de peixe defumado brasileiro (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.)

Title: Characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium maltaromaticum* C2, isolated from Brazilian smoked fish (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.)

Título: Caracterización de bacteriocinas producidas por *Carnobacterium maltaromaticum* C2, aislado de pescado ahumado brasileño (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.)

Resumo: O aumento na demanda por alimentos saudáveis e minimamente processados impulsiona a busca por novos agentes antimicrobianos. As bacteriocinas são peptídeos produzidos via ribossomo por algumas espécies de bactérias, podendo ser usadas na conservação e garantia da inocuidade de alimentos, não apresentando as possíveis ações tóxicas de conservadores clássicos amplamente utilizados na indústria alimentícia. *Carnobacterium maltaromaticum* C2 foi isolado de peixe defumado brasileiro (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.), e apresenta grande capacidade de inibir a multiplicação de *Listeria monocytogenes*, demonstrando seu potencial para aplicação na bioconservação de alimentos. Em estudos anteriores, foi demonstrado que essa linhagem bacteriana produz compostos antimicrobianos de origem proteica. Neste trabalho, foram avaliados aspectos gerais da produção de bacteriocinas por *C. maltaromaticum* C2, assim como sua purificação e caracterização. *C. maltaromaticum* C2 produz bacteriocinas entre 5 e 25°C, com ótimo entre 20 e 25°C. Do mesmo modo, a produção desses compostos foi maior em caldo APT (All purpose Tween), entretanto para as etapas de purificação foram utilizados o caldo BHI (Brain heart infusion) e CAA (Casamino acids), por causarem menos interferência no processo. *Lactobacillus sakei* e *L. monocytogenes* foram inibidos pelas bacteriocinas parcialmente purificadas produzidas por *C. maltaromaticum* C2, e seus peptídeos antimicrobianos apresentaram moderada estabilidade térmica quando expostos a 100°C por 30 minutos. Foram utilizadas duas técnicas para extração e purificação das bacteriocinas, a técnica de adsorção-dessorção às células produtoras, e a purificação com a resina XAD-16, baseada em interações hidrofílicas e hidrofóbicas com os peptídeos, seguida de extração em fase sólida, sendo que este último processo de purificação resultou em um extrato com alto teor de pureza, como observado durante as análises por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa. Com o auxílio de técnicas de espectrometria de massas, foi detectado nos extratos obtidos a presença das carnobacteriocinas BM1 e B1, assim como o peptídeo antimicrobiano CbnX. Este trabalho é pioneiro na purificação de CbnX, pois anteriormente havia somente a descrição de seu gene, mas não havia sido descrita a purificação do peptídeo. Neste sentido, a linhagem estudada é única até o momento e poderá favorecer estudos de expressão gênica de bacteriocinas, bem como a otimização de processos de bioconservação.

Summary: The high demand for healthy and minimally processed foods has increased the search for new antimicrobial agents. Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides produced by some bacteria, and are useful for biopreservation and food safety, without the possible toxic effects of classical preservatives widely used in food industry. *Carnobacterium maltaromaticum* C2 was isolated from Brazilian smoked fish (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.), and it inhibits *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. In previous studies, it was demonstrated that this bacterial strain produces bacteriocins. In this study, general aspects of the production of bacteriocins by *C. maltaromaticum* C2 were evaluated, as well as their purification and characterization. *C. maltaromaticum* C2 produces bacteriocins between 5 and 25°C, with the optimum incubation temperature between 20 and 25°C. Similarly, the production of these compounds was higher in APT (All-purpose Tween) broth. However, for the purification steps, BHI (Brain heart infusion) broth and CAA (Casamino acids) broth were used due to their low interference with the processes. *Lactobacillus sakei* and *L. monocytogenes* were inhibited by the partially purified bacteriocins produced *C. maltaromaticum* C2, and their antimicrobial peptides showed moderate thermal stability when tested at 100°C by 30 minutes. Two techniques for extraction and purification

of the antimicrobial peptides were used, the adsorption-desorption of bacteriocins to the producer cells, and the purification with XAD-16 resin, based on hydrophilic and hydrophobic interactions with the peptides, followed by a step of solid phase extraction. The latter resulted in an extract with high purity, as observed by the analysis with reverse-phase high performance liquid chromatography. With mass spectrometry techniques, carnobacteriocins BM1 and B1 were detected, as well as the antimicrobial peptide CbnX. This is an innovative work because the purification of CbnX had never been reported, except its gene. In this respect, this *C. maltaromaticum* strain is unique until this moment, and may promote researches on gene expression, as well the optimization of biopreservation processes.

Resumen: El aumento de la demanda de alimentos sanos y mínimamente procesados impulsa la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos. Las bacteriocinas son péptidos producidos a través de los ribosomas por algunas especies de bacterias, que pueden ser utilizados en la conservación y seguridad alimentaria, sin las posibles acciones tóxicas de los clásicos conservadores utilizados en la industria alimentaria. *Carnobacterium maltaromaticum* C2 fue aislado de pescado ahumado brasileño (Surubim, *Pseudoplatystoma* sp.), y muestra una gran habilidad para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, lo que demuestra su potencial de aplicación en la conservación de alimentos. En estudios anteriores, se ha demostrado que esta cepa bacteriana produce proteínas antimicrobianas. En este estudio, se evaluaron aspectos generales de la producción de bacteriocinas por *C. maltaromaticum* C2, así como su purificación y caracterización. *C. maltaromaticum* C2 produce bacteriocinas entre 5 y 25°C, con óptimo entre 20 y 25°C. Del mismo modo, la producción de estos compuestos fue mayor en caldo APT (All purpose Tween), sin embargo, para las etapas de purificación se utilizaron caldo infusión cerebro corazón y caldo CAA (Casamino acids) debido a que causan una menor interferencia en el proceso. *Lactobacillus sakei* y *L. monocytogenes* fueron inhibidos por las bacteriocinas parcialmente purificadas producidas por *C. maltaromaticum* C2, y sus péptidos antimicrobianos mostraron estabilidad térmica moderada cuando se exponen a 100°C durante 30 minutos. Se han utilizado dos técnicas de extracción y purificación de bacteriocinas, la técnica de adsorción-desorción de bacteriocinas en las células productoras, basadas en la adsorción y desorción de péptidos en las células productoras, y la purificación con la resina XAD-16, sobre la base de las interacciones hidrofílicas y hidrofóbicas con péptidos, seguido por la extracción en fase sólida. Este último proceso de purificación resultó en un extracto de alta pureza, según lo observado durante el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia en columna de fase inversa. Con la ayuda de las técnicas de espectrometría de masas, se detectó en los extractos la presencia de las carnobacteriocinas BM1 y B1, así como el péptido antimicrobiano CbnX. Este trabajo es pionero en la purificación de CbnX porque antes sólo había la descripción de su gene, pero no se había descrito la purificación de lo péptido. En este sentido, esta cepa es única hasta el momento y puede contribuir con los estudios de la expresión génica de bacteriocinas, así como la optimización de procesos para la conservación de alimentos.

Comissão: Elaine Cristina Pereira de Martinis
Adriano Brandellii
Augusto Cesar Cropanese Spadaro

Aluno: **Fernanda de Almeida**

Orientador: Juliana Pfrimer Falcão

Defesa: 16/12/2011

Título: Tipagem molecular e análise da diversidade genética de linhagens de *Salmonella* Infantis isoladas de humanos e alimentos no Estado de São Paulo, Brasil.

Title: Molecular typing and analysis of the genetic diversity of *Salmonella* Infantis strains isolated from humans and food in São Paulo, Brazil.

Título: Tipaje molecular y análisis de la diversidad genética de linajes de *Salmonella* Infantis aislados de humanos y alimentos en el Estado de São Paulo, Brasil.

Resumo: *Salmonella* spp. é o agente bacteriano causador de doenças de origem alimentar de maior ocorrência no mundo. Dentre as diversas sorovariedades de *Salmonella*, a *Infantis* tem apresentado uma crescente importância devido ao aumento do seu isolamento e da resistência a antimicrobianos. Apesar de sua relevância, há uma escassez de estudos de tipagem molecular de *S. Infantis* isoladas no país. Os objetivos deste estudo foram realizar a tipagem molecular de linhagens de *Salmonella* *Infantis* isoladas de humanos e de alimentos no Brasil, e analisar comparativamente a diversidade genética entre elas e com outras linhagens isoladas de diversos locais do mundo. Ademais, objetivou-se verificar o perfil de resistência a antimicrobianos e comparar o poder discriminatório das técnicas de Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) e Multilocus sequence typing (MLST). Foram estudadas 35 linhagens de *S. Infantis*, isoladas de humanos (25) e alimentos (10), entre 1984 e 2009, provenientes de várias cidades do Estado de São Paulo, Brasil. Foi realizado o teste de susceptibilidade a 15 antimicrobianos pelo método de disco-difusão. A tipagem molecular foi realizada através das técnicas de ERIC-PCR e PFGE para todas as linhagens e MLST para 16 linhagens. O índice de discriminação (ID) para as técnicas ERIC-PCR, PFGE e MLST foi calculado através de uma variação do índice de diversidade de Simpson. Do total de 35 linhagens, 27 (77%) foram susceptíveis a todos os 15 antibióticos testados. Entretanto, duas linhagens (5,7%) foram resistentes a três ou mais antibióticos de diferentes classes. O dendrograma de similaridade genética gerados com os dados de ERIC-PCR agrupou todas as linhagens, com exceção de uma, em dois grandes grupos, denominados A e B. No grupo A, as linhagens apresentaram similaridade superior a 85,9% entre si e no grupo B apresentaram similaridade superior a 88,7%. Entre as linhagens dos grupos A e B, a similaridade foi superior a 84,5%. O dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de PFGE, após digestão com XbaI e SpeI, agrupou todas as linhagens, com exceção de uma, em dois grupos, denominados G e H. No grupo G, as linhagens apresentaram similaridade superior a 70,2% e no grupo H, similaridade superior a 74,5%. Entre as linhagens dos grupos G e H, a similaridade foi superior a 66,6%. Por MLST, todas as 16 linhagens foram caracterizadas como ST32. O ID de ERIC-PCR foi de 0,859; de PFGE (XbaI+SpeI) foi de 1,0; e de MLST foi zero. Os resultados de ERIC-PCR, PFGE e MLST sugerem que as linhagens de *S. Infantis* estudadas descendem de um precursor predominante que pouco se diferenciou genotipicamente e que tem contaminado tanto alimentos quanto humanos, ao longo de 25 anos no Estado de São Paulo. Por MLST, observou-se que as linhagens de *S. Infantis* isoladas no Brasil tem uma alta similaridade genética com as maioria das *Infantis* isoladas de diversos locais do mundo, o que sugere que tais linhagens advenham de um precursor comum. A metodologia de PFGE foi mais eficiente em diferenciar linhagens de *S. Infantis* do que ERIC-PCR e MLST.

Summary: *Salmonella* spp. is the most frequent causative agent of bacterial food-borne diseases in the world. Among the various serovars of *Salmonella*, the *Infantis* has growing importance due to the increase in the isolation and antimicrobial resistance. Despite of the great importance of this serovar, there is a paucity of molecular typing studies with *S. Infantis* strains isolated in Brazil. The aims of this study were to molecular type *Salmonella* *Infantis* strains isolated from humans and food in Brazil, and to comparatively analyze the genetic diversity among them and with other strains isolated around the world. Besides, it was aimed to verify their antimicrobial resistance profile and to compare the discriminatory power of Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) e

Multilocus sequence typing (MLST) techniques. A total of 35 *S. Infantis* strains, isolated from humans (25) and food (10), between 1984 and 2009, from various cities of São Paulo, Brazil were studied. Drug resistance was investigated by the disk-diffusion test against 15 antimicrobials. Molecular typing was performed by ERIC-PCR, PFGE for all strains and MLST for 16 strains. The discrimination index (DI) of ERIC-PCR, PFGE and MLST was calculated using a variation of the Simpson's diversity index. Of the total of 35 *S. Infantis* strains, 27 strains (77%) were susceptible to all 15 antibiotics tested. However, two strains (5.7%) were resistant to three or more antibiotics of different classes. The dendrogram of genetic similarity generated with ERIC-PCR data grouped all the strains, except one, in two large groups, designated A and B. In group A, the strains showed more than 85.9% similarity among each other and in group B, the strains showed more than 88.7% similarity. Among groups A and B strains the similarity was above 84.5%. The dendrogram of genomic similarity generated with PFGE data after digestion with XbaI and SpeI, grouped all the strains, except one, in two groups, named G and H. In group G, the strains showed similarity above 70.2% and, in group H 74.5% similarity. Among the strains of groups G and H, the similarity was above 66.6%. By MLST, all 16 strains were characterized as ST32. The DI of ERIC-PCR was 0.859; of PFGE was 1.0 and of MLST was zero. The results of ERIC-PCR, PFGE and MLST suggest that the *S. Infantis* strains studied descended from a predominant ancestor that little differed genotypically and has been contaminated both food and human during 25 years in the São Paulo State. By MLST, it was found that *S. Infantis* strains isolated in Brazil, presented a high genetic similarity with most isolated of the *Infantis* isolated around the world. The PFGE was more efficient to discriminate *S. Infantis* strains than ERIC-PCR and MLST.

Resumen: *Salmonella* spp. es el agente bacteriano causador de enfermedades de origen alimentar de mayor ocurrencia en el mundo. En medio a las diversas serovariedades de *Salmonella*, el *Infantis* ha presentado una creciente importancia, debido al aumento de su aislamiento y de resistencia a los antimicrobianos. A pesar de su importancia, hay una escasez de estudios de tipaje molecular de *S. Infantis* aislados en el país. El objetivo de este estudio fue realizar el tipaje molecular de linajes de *Salmonella Infantis* aislados de humanos y de alimentos em Brasil, y evaluar comparativamente la diversidad genética entre ellos y con otros linajes aislados de diversos locales del mundo. Además, se objetivó verificar el perfil de resistencia a los antimicrobianos y comparar el poder discriminatorio de las técnicas de Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) y Multilocus sequence typing (MLST). Treinta y cinco linajes de *S. Infantis* fueron estudiados, aislados de humanos (25) y de alimentos (10), provenientes de varias ciudades del Estado de São Paulo, Brasil, entre los años 1984 y 2009. Fue realizado el teste de susceptibilidad a 15 antimicrobianos por el método de disco-difusión. El tipaje molecular fue realizado por medio de las técnicas de ERIC-PCR y PFGE para todos los linajes y MLST para 16 lineajes. El índice de discriminación (ID) para las técnicas ERIC-PCR, PFGE y MLST fue calculado a través de una variación del índice de diversidad de Simpson. De un total de 35 linajes de *S. Infantis*, 27 linajes (77%) fueron susceptibles a todos los antibióticos testados. Entretanto, dos linajes (5,7%) fueron resistentes a tres o más antibióticos de diferentes clases. El dendrograma de similitud genético generado con los datos de ERIC-PCR agrupó todos los linajes, con excepción de una, en dos grandes grupos, denominados A y B. En el grupo A, los linajes presentaron similitud superior a 85,9% entre sí y en el grupo B presentaron similitud superior a 88,7%. Entre los linajes de los grupos A y B, la similitud fue superior a 84,5%. El dendrograma de similitud genómica generado con los datos de PFGE pos digestión con XbaI y SpeI agrupó todos los linajes, con excepción de uno, en dos grupos, denominados G y H. En el grupo G, los linajes presentaron similitud superior a 70,2% y en el grupo H, similitud superior a 74,5%. Entre los linajes de los grupos G y H, la similitud fue superior a 66,6%. Por MLST, todos los 16 linajes fueron caracterizados como ST32. El ID de ERIC-PCR fue de 0,859; de PFGE (XbaI+SpeI) fue de 1,0; y de MLST fue cero. Los resultados de ERIC-PCR, PGFE y MLST sugieren que los linajes de *S. Infantis* estudiados descienden de un precursor predominante que poco se diferenció genotípicamente y que tiene contaminado tanto los alimentos cuanto los humanos a lo largo de 25 años en el Estado de São Paulo. Por MLST se observó que los linajes de *S. Infantis* aislados en Brasil tienen una alta similitud genética de los *Infantis* aislados de diversos locales del mundo, lo que sugiere que tales linajes advienen de un precursor común. La metodología de PFGE fue más eficiente en diferenciar linajes de *S. Infantis* que ERIC-PCR y MLST.

Comissão: Juliana Pfrimer Falcão
Mariza Landgraf
Eliana Guedes Stehling

Aluno: Mariana Tomazini Pinto

Orientador: Simone Kashima Haddad

Defesa: 05/08/2011

Título: Perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4+ na infecção pelo HTLV-1

Title: Gene expression profiling in CD4+ T-cells in HTLV-1 infection.

Título: Perfil de expresión génica de linfocitos T CD4+ en la infección por HTLV-1

Resumo: O vírus linfotrófico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) está associado etiológicamente à duas principais manifestações clínicas: a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e a mielopatia associada ao HTLV-1 ou paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Apenas 2 a 5% dos indivíduos infectados desenvolvem doenças associadas ao vírus, enquanto a maioria permanece assintomática. A HAM/TSP é uma manifestação inflamatória do sistema nervoso central e o mecanismo pelo qual o HTLV-1 induz o surgimento de HAM/TSP ainda não está totalmente esclarecido. Os linfócitos T CD4+ são os principais reservatórios do HTLV-1 in vivo e possuem uma participação importante na resposta imunológica dirigida a este retrovírus. Essas células são ativadas precocemente durante a infecção pelo HTLV-1 e auxiliam na resposta dos linfócitos T CD8 citotóxicos (CTLs), bem como na produção de anticorpos. No presente estudo, foi avaliado o perfil de expressão gênica global dos linfócitos T CD4+ isolados de portadores assintomáticos (HAC), pacientes com HAM/TSP e de indivíduos saudáveis (CT) por meio da metodologia de microarray. Os linfócitos T CD4+ utilizados foram isolados por separação imunomagnética e foram realizados microarrays de doze amostras individuais: quatro amostras do grupo CT, quatro amostras do grupo HAC e quatro do grupo HAM/TSP. Os dois últimos grupos continham duas amostras com alta e duas com baixa expressão da proteína Tax. As análises de agrupamento hierárquico revelaram que o perfil de expressão gênica dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 difere dos indivíduos do grupo CT pela formação de dois agrupamentos distintos. Ademais, os indivíduos infectados pelo HTLV-1 se agruparam de acordo com o estado clínico e independente da expressão de Tax. Foram realizadas as comparações entre os grupos CT vs. HAC, CT vs. HAM/TSP e HAM/TSP vs. HAC e os dados demonstraram que 221, 254 e 70 genes estavam diferencialmente expressos, respectivamente. Além disso, foram observados 86 genes presentes nas interseções entre CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP, 25 genes entre CT vs. HAM/TSP x HAM/TSP vs. HAC e apenas um gene entre CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP. Estes genes diferencialmente expressos estavam associados à citocinas, lise e migração celular. Os achados foram validados por PCR quantitativo em um total de 23 indivíduos assintomáticos, 17 com HAM/TSP e 25 indivíduos saudáveis. A validação evidenciou o aumento da expressão dos genes PXN, CXCR4, PRF1 e Foxp3 no grupo HAM/TSP em relação ao grupo HAC, além do aumento de IL-27 nos indivíduos do grupo HAC comparados com os indivíduos do grupo HAM/TSP. Adicionalmente, foi realizada a quantificação dos níveis protéicos de PRF1, GZMB, CXCR4 por citometria de fluxo. Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre os diferentes grupos analisados. Ainda, por meio de citometria de fluxo, a população de células CD3+CD4+CD25hiFoxp3+, bem como CD4+Foxp3+ foram analisadas e observou-se maiores níveis de expressão de CD4+Foxp3+ nos indivíduos infectados pelo HTLV-1. A porcentagem de células CD3+CD4+CD25hiFoxp3+ não mostrou diferença significativa entre os três grupos comparados. Os resultados evidenciados neste projeto ressaltam a importância das células CD4+ no controle da resposta imune contra a infecção pelo HTLV-1. O aumento na expressão gênica de PXN e CXCR4, que fazem parte da via de sinalização de CXCR4, sugere a ocorrência de migração celular nos indivíduos com HAM/TSP, provavelmente para o SNC. Além disso, o aumento das células Treg parecem suprimir a atividade das células T CD8+ pela via perforina/granzima, que por sua vez aumentaria a carga proviral, aumentando assim o risco de desenvolvimento de HAM/TSP.

Summary: Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is etiologically associated with two major diseases: the adult T cell lymphoma/leukaemia (ATLL) and the HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). About 2 to 5% of infected individuals will develop HTLV-1-related diseases, while the majority remains life-long asymptomatic carriers of the virus. HAM/TSP is an inflammatory manifestation of central nervous system and the

mechanism involved in HAM/TSP development is not well elucidated. CD4+ T cells are the predominant subset of cells infected with HTLV-1 in vivo and they are also important as effector cells against the infection. These cells are early activated during infection with HTLV-1 and assist the response of CD8 cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and antibody production. To identify genes differentially expressed among non-infected individuals (CT), asymptomatic (HAC) and HAM/TSP patients we applied the microarray using CD4+ T cells isolated from these individuals. The CD4+ T lymphocytes were isolated by magnetic cell separation system and twelve samples underwent microarray analysis, as follows: 4 CT, 4 HAC and 4 HAM/TSP samples. Two samples had high tax expression and two samples had low tax expression for both infected groups. The hierarchical clustering analysis showed that the gene expression profile of infected individuals is distinct from healthy individuals because two separate clusters were observed. HTLV-1-infected individuals clustering meets with patients clinical status. However, HTLV-1 CD4+ T cells clustering did not correlate with Tax protein expression. We found 221 genes differently expressed between CT and HAC groups, 254 genes between CT and HAM/TSP and 70 genes between HAC and HAM/TSP. Moreover, we observed 86 genes differently expressed in the intersections between CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP, 25 genes between CT vs. HAM/TSP x HAM/TSP vs. HAC and only one gene between CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP. These genes were associated with cytokines, cell lysis and cell migration. These results were validated by quantitative PCR in 23 HTLV-1 asymptomatic carriers, 17 patients with HAM/TSP and 25 healthy individuals. The validation revealed increased levels of expression of the genes PXN, CXCR4, PRF1, and Foxp3 in the HAM/TSP group compared with HAC group. IL-27 gene expression was increased in HAC group when compared with HAM/TSP group. Additionally, we performed the protein quantification of PRF1, GZMB, and CXCR4 by flow cytometry. However, no difference was observed among the three groups. We also analyzed CD3+CD4+CD25hiFoxp3+ and CD4+Foxp3+ populations by flow cytometry. There was an increase of CD4+Foxp3+ expression in HTLV-1-infected individual. No differences were observed in CD3+CD4+CD25hiFoxp3+ population among the three groups. The results shown in this project highlight the importance of CD4+ cells in controlling the immune response against HTLV-1. The gene expression profile of PXN and CXCR4 was increased. These genes are related to CXCR4 signaling pathway that can result in CD4+ T cells migration, probably to the central nervous system. It is also suggested that Treg cells can suppress the T CD8+ activity through perforin/granzyme pathway. This pathway enhances the proviral load increasing the risk of HAM/TSP development.

Resumen: El virus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) está asociado etiológicamente a dos principales manifestaciones clínicas: la leucemia/linfoma de células T del adulto (ATLL) y la mielopatía asociada al HTLV-1 o paraparesia espática tropical (HAM/TSP). Apenas del 2 al 5% de los individuos infectados desarrollan enfermedades asociadas al virus, mientras la mayoría permanece asintomática. La HAM/TSP es una manifestación inflamatoria del sistema nervioso central y el mecanismo por lo cual el HTLV-1 induce el surgimiento de HAM/TSP todavía no está completamente esclarecido. Los linfocitos T CD4+ son los principales reservorios del HTLV-1 in vivo y tienen una participación importante en la respuesta inmunológica dirigida a este retrovirus. Esas células son activadas temprano durante la infección por el HTLV-1 y ayudan en la respuesta de los linfocitos T CD8 citotóxicos (CTLs), y también en la producción de anticuerpos. En el presente estudio, fue evaluado el perfil de expresión génica global de los linfocitos T CD4+ aislados de portadores asintomáticos (HAC), pacientes con HAM/TSP y de individuos sanos (CT) a través de la metodología de microarray. Los linfocitos T CD4+ utilizados fueron aislados por separación inmunomagnética y fueron realizados microarrays de doce muestras individuales: cuatro muestras del grupo CT, cuatro muestras del grupo HAC y cuatro del grupo HAM/TSP. Los dos últimos grupos contenían dos muestras con alta y dos con baja expresión de la proteína Tax. Los análisis del agrupamiento jerárquico relevaron que el perfil de expresión génica de los individuos infectados por el HTLV-1 es diferente de los individuos del grupo CT por la formación de dos agrupamientos distintos. Además, los individuos infectados por el HTLV-1 se agruparon de acuerdo con el estado clínico e independiente de la expresión de Tax. Fueron realizadas las comparaciones entre los grupos CT vs. HAC, CT vs. HAM/TSP y HAM/TSP vs. HAC y los datos demostraron que 221, 254 y 70 genes estaban diferencialmente expresos, respectivamente. Incluso, fueron observados 86 genes presentes en las intersecciones entre CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP, 25 genes entre CT vs. HAM/TSP

x HAM/TSP vs. HAC y apenas un gen entre CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP. Estos genes diferencialmente expresos estaban asociados a las citocinas, lise y migración celular. Los resultados fueron validados por PCR cuantitativo en un total de 23 individuos asintomáticos, 17 con HAM/TSP y 25 individuos sanos. La validación evidenció el aumento de la expresión de los genes PXN, CXCR4, PRF1 y Foxp3 en el grupo HAM/TSP en relación al grupo HAC, además del aumento de IL-27 en los individuos del grupo HAC comparados a los individuos del grupo HAM/TSP. Adicionalmente, fue realizada la cuantificación de los niveles proteicos de PRF1, GZMB, CXCR4 por citometría de flujo. Sin embargo, ninguna diferencia fue observada entre los diferentes grupos analizados. Todavía, por citometría de flujo, la población de células CD3+CD4+CD25hiFoxp3+, y también CD4+ Foxp3+, fue analizada y mayores niveles de expresión de CD4+Foxp3+ fueron observados en los individuos infectados por el HTLV-1. El porcentaje de células CD3+CD4+CD25hi Foxp3+ no mostró diferencia significativa entre los tres grupos comparados. Los resultados evidenciados en este proyecto reafirman la importancia de las células CD4+ en el control de la respuesta inmune contra la infección por el HTLV-1. El aumento en la expresión génica de PXN y CXCR4, que son parte de la vía de señalización de CXCR4, sugiere la ocurrencia de migración celular en los individuos con HAM/TSP, probablemente para el SNC. Además, el aumento de las células Treg parecen suprimir la actividad de las células T CD8+ por la vía perforina/granzima, que por su vez aumentaría la carga proviral, aumentando los riesgos de desarrollo de HAM/TSP.

Comissão: Simone Kashima Haddad
Luiz Carlos Junior Alcântara
Lucia Helena Faccioli

Aluno: Renata Ignácio Bertozzi

Orientador: Cleni Mara Marzocchi Machado

Defesa: 29/04/2011

Título: Avaliação do efeito de contraceptivos hormonais sobre o sistema complemento

Title: Evaluation of the effect of hormonal contraceptives on the complement system

Resumo: A ocorrência de trombose está freqüentemente associada com a presença de um ou mais fatores de riscos, os quais podem ser genéticos e/ou adquiridos, tais como as mudanças hormonais que ocorrem durante a gravidez, a terapia de reposição hormonal e o uso de contraceptivos hormonais combinados (CHC). A inflamação, por sua vez, é uma importante resposta do organismo às agressões e envolve vários mecanismos biológicos relacionados entre si e altamente regulados, tais como: coagulação, fibrinólise, ativação do sistema complemento (SC), antioxidação e regulação hormonal. Fisiologicamente, os sistemas complemento e da coagulação compartilham componentes. A ativação do fator XII da coagulação é controlada pela mesma proteína reguladora da ativação do sistema complemento, o inibidor de C1. A deficiência do inibidor de C1 leva a uma patologia conhecida como angioedema hereditário. No entanto, uma manifestação clínica similar ao angioedema tem sido descrita em mulheres que usam CHC ou recebem terapia de reposição hormonal com estrogênio (E). Esta influência do estrogênio na coagulação e no SC também é evidenciada pela ação regulatória do E sobre a expressão do fator XII e dos seus níveis plasmáticos. Considerando o efeito pleiotrópico do E, e as interações do SC e da hemostasia, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes CHC sobre: a) a atividade hemolítica (AH) do SC e ativação das vias clássica/lectina e alternativa; b) a atividade opsonizante do SC em mediar o burst oxidativo dos neutrófilos; e c) a função dos receptores para complemento (CR) em mediar o burst oxidativo dos neutrófilos. Nós estudamos 5 CHC diferentes e observamos que a) drospirenona + 30g E mostrou uma tendência a aumentar o burst oxidativo mediado por CR; b) gestodeno + 20g E mostrou redução da capacidade opsonizante do SC; c) levonorgestrel + 30g E e gestodeno + 20g E promoveram uma redução no número de neutrófilos positivos para a expressão de CR1; d) drospirenona + 30g E e drospirenona + 20g E promoveram um aumento da AH da via clássica (VC) do SC; e) levonorgestrel + 30g E promoveu uma redução da AH da VC do SC; f) drospirenona + 30g E, gestodeno + 20g E e levonorgestrel + 30g E promoveram uma diminuição do nível sérico de C4d, produto da ativação das vias clássica/lectina do SC; g) levonorgestrel + 30g E apresentou um aumento da concentração sérica de inibidor de C1; h) nenhum dos CHC mostrou diferenças na ativação da via alternativa do SC. Os resultados mostram a importância de considerar os diferentes grupos de CHC nas comparações com o Grupo Controle, uma vez que algumas diferenças foram significativas apenas para CHC em particular. Estas observações podem contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia dos processos inflamatórios associados ao uso de estrogênios.

Summary: The occurrence of thrombosis is often associated with the presence of one or more risk factors, which may be genetic and/or acquired, such as hormonal changes that occur during pregnancy, hormone replacement therapy and the use of combined hormonal contraceptives (CHC). The inflammation in turn, is an important body's response to the aggression and involves several biological mechanisms related and highly regulated, such as coagulation, fibrinolysis, activation of the complement system (CS), oxidation and hormonal regulation. Physiologically, the complement and coagulation systems share components. Activation of coagulation factor XII is controlled by the same regulatory protein activation of the complement inhibitor C1. The deficiency of C1 inhibitor leads to a condition known as hereditary angioedema. However, a clinical manifestation similar to angioedema has been reported in women using CHC or receiving hormone replacement therapy with estrogen (E). The influence of E on coagulation and the CS is also evidenced by the regulatory action of E on the expression of factor XII and its plasma levels. Considering the pleiotropic effects of E, and the interactions of CS and hemostasis, the goal of this study was to evaluate the effect of different CHC on: a) hemolytic activity (HA) CS and activation of classical/lectin and alternative pathways, b) the opsonizing activity of the CS in mediating the oxidative burst of neutrophils, and c) the function of receptors for complement (CR) in mediating the oxidative

burst (OB) of neutrophils. We studied 5 different CHC and data showed: a) drospirenone + 30g E increase of the OB neutrophils mediated by CR; b) gestodene + 20g E had a reduced opsonizing ability; c) levonorgestrel + 30g E and gestodene + 20g E promoted a reduction of neutrophils positive for the expression of CR1, d) drospirenone + 30g E and drospirenone + 20g E promoted an increase in HA for classical pathway (CP); e) levonorgestrel + 30g E reduced the HA for CP; f) drospirenone + 30g E and gestodene + 20g E and levonorgestrel + 30g E reduced the serum level of C4d; g) levonorgestrel + 30g E showed an increase of the serum level of C1 inhibitor; h) none of CHC showed differences in activation of the alternative pathway in CS. The results show the importance of considering the different groups of CHC in comparison with the control group, since some differences were significant only for CHC in particular. These observations may contribute to the understanding of the mechanisms involved in the pathophysiology of inflammatory processes associated with estrogen use.

Comissão: Cleni Mara Marzocchi Machado,
Lourdes Isaac
Iara José de Messias Reason

Aluno: Sandra Mara Burin

Orientador: Fabíola Attié de Castro

Defesa: 01/07/2011

Título: Efeito do veneno bruto e da L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai* em células BCR-ABL positivas

Title: Effect of *Bothrops pirajai* crude venom and L-amino acid oxidase in BCR-ABL positive cells

Título: Efecto del veneno bruto y de la L-aminoácido oxidasa de *Bothrops pirajai* en células BCR-ABL positivas.

Resumo: A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa caracterizada citogeneticamente pela presença do cromossomo Philadelphia (Ph) e molecularmente pelo neogene *bcr-abl1* que codifica a oncoproteína BCR-ABL com alta atividade de tirosina-quinase. A célula leucêmica BCR-ABL+ apresenta baixa adesão ao estroma medular, resistência à apoptose e potencial mitogênico exacerbado. A LMC possui curso evolutivo trifásico (fase crônica, acelerada e blástica) e seu tratamento pode ser realizado por meio de diferentes modalidades terapêuticas, destacando-se o mesilato de imatinibe (MI) que inibe a TK BCR-ABL induzindo altas taxas de remissão citogenética dos pacientes na fase crônica da doença. Apesar do MI ser eficiente, os pacientes na fase acelerada e blástica da doença são comumente refratários a essa terapia e na fase crônica há casos de resistência ao MI descritos. Nesse contexto, potenciais novos fármacos são investigados para melhorar a eficiência da terapia da LMC. Nesse estudo, investigamos o efeito do veneno bruto (VB) e da enzima L-amino-ácido-oxidase (LAAO) da *Bothrops pirajai* em desencadear apoptose em células BCR-ABL+. A apoptose das células HL-60 e HL-60.BCR-ABL foi quantificada pela detecção da porcentagem de células com núcleos hipodiplóides pela da citometria de fluxo e confirmada pela observação da ativação das caspases 3, 8 e 9 por western-blot. Os resultados obtidos indicam que a LAAO é capaz de induzir apoptose em células HL-60 e HL-60.BCR-ABL por ativação das vias extrínseca e intrínseca. Além disso, foi verificado que a LAAO diminui a fosforilação de BCR-ABL em células HL-60.BCR-ABL e quando associada ao MI potencializou a inibição da atividade quinase de BCR-ABL. Os dados da presente investigação indicaram ainda que a LAAO é capaz de modular a expressão de *bad*, *bak*, *bax*, *bid*, *bimel*, *fas*, *fasl*, *a1*, *bcl-2*, *bcl-xl*, *bcl-w* e *c-flip*, genes reguladores da apoptose celular. Apesar do pouco conhecimento acerca do mecanismo de ação dessa toxina, os dados obtidos sugerem que a LAAO possui o potencial de estimular a apoptose nas linhagens HL-60 e HL-60.BCR-ABL e aumentar o efeito do inibidor da atividade quinase, MI, dados relevantes para estudos futuros associados a descrição de novos fármacos contra leucemia mielóide crônica.

Summary: Chronic myeloid leukemia (CML) is a myeloproliferative disorder cytogenetically characterized by the presence of Philadelphia chromosome (Ph) and molecularly by *bcr-abl1* neogene that encodes the BCR-ABL oncoprotein with high tyrosine kinase (TK) activity. The leukemic cell BCR-ABL+ presents poor adhesion to bone marrow stroma, resistance to apoptosis and exacerbated mitogenic potential. The CML has a three-phase course (chronic, accelerated and blastic phase) and its treatment can be performed by different therapeutic modalities, especially the imatinib mesylate (IM) that inhibits the TK BCR-ABL inducing high rates of cytogenetic remission in chronic phase. Although IM is effective, patients in accelerated and blastic phases of the disease are often refractory to this therapy and there are also cases of resistance to IM described in chronic phase. In this context, potential new drugs are investigated to improve the efficiency of the therapy of CML. In this study, we investigated the effect of crude venom (CV) and of the enzyme L-amino acid oxidase (LAAO) from *Bothrops pirajai* in triggering apoptosis in BCR-ABL+. The apoptosis of HL-60 cells and HL-60. BCR-ABL was quantified by detecting the percentage of cells with hypodiploid nuclei by flow cytometry and confirmed by observation of the activation of caspases 3, 8 and 9 by Western blot. The results indicate that LAAO is able to induce apoptosis in HL-60 cells and HL-60. BCR-ABL by activation of the extrinsic and intrinsic pathways. Furthermore, it was found that LAAO decreases phosphorylation of BCR-ABL in HL-60 cells. BCR-ABL when associated with IM potencialized the inhibition of kinase activity of BCR-ABL. The data from this study also indicated that the LAAO is able to modulate the expression of *bad*, *bak*, *bax*,

bid, bimel, fas, FasL, A1, bcl-2, bcl-xl, bcl-w and c-flip, regulatory genes of apoptosis. Even though there is little knowledge about the mechanism of action of this toxin, the data obtained suggests that LAAO has the potential to stimulate apoptosis in HL-60 lines and HL-60. BCR-ABL and increase the effect of the inhibitor of protein kinase activity, MI, relevant data for future studies associated with the description of new drugs against chronic myeloid leukemia.

Resumen: La leucemia mieloide crónica (LMC) es una enfermedad mieloproliferativa caracterizada citogenéticamente por la presencia del cromosoma Philadelphia (Ph) y molecularmente por el neogen bcr-abl1 que codifica la oncoproteína BCR-ABL con alta actividad de tirosina-cinasa. La célula leucémica BCR-ABL+ presenta baja adhesión al estroma medular, resistencia a la apoptosis y el potencial mitogénico alterado. La LMC posee un curso evolutivo trifásico (fase crónica, acelerada y blástica) y su tratamiento puede ser realizado por medio de diferentes modalidades terapéutica, destacándose el mesilato de imatinibe (MI) que inhibe la TK BCR-ABL induciendo altas tasas de remisión citogenética de los pacientes en la fase crónica de la enfermedad. A pesar del MI ser eficiente, los pacientes en la fase acelerada y blástica de la enfermedad son comúnmente reflejados a esa terapia y en la fase crónica hay casos de resistencia al MI descritos. En este contexto, potenciales nuevos fármacos son investigados para mejorar la eficiencia de la terapia de la LMC. En este estudio, investigamos el efecto del veneno bruto (VB) y de la enzima L-amino-ácido-oxidasa (LAAO) de *Bothrops pirajai* em desencadena apoptosis en células BCR-ABL+. La apoptosis de las células HL-60 y HL-60.BCR-ABL fue cuantificada por la detección de células nucleadas hipodiploides por citometría de flujo y confirmada por la activación de las caspasas 3, 8 y 9 por westernblot. Los resultados obtenidos indicaron que la LAAO es capaz de inducir la apoptosis en células HL-60 y HL-60.BCR-ABL por activación de las vías intrínsecas y extrínsecas. Además de esto, fue verificada que la LAAO disminuye la fosforilación de BCR-ABL en células HL-60.BCR-ABL y cuando está asociada al MI fue potencializada la inhibición de la actividad cinasa de BCR-ABL. Los datos de la presente investigación indicaron que la LAAO es capaz de modular la expresión de: bad, bak, bax, bid, bimel, fas,fasl, a1, bcl-2, bcl-xl, bcl-w y c-flip, los cuales son genes reguladores de la apoptosis celular. Apesar del poco conocimiento acerca del mecanismo de la acción de esta toxina, los datos obtenidos sugieren que la LAAO posee el potencial de estimular la apoptosis en los linajes celulares HL-60 y HL-60.BCR-ABL, así como también aumenta el efecto del inhibidor de la actividad cinasa, MI, datos relevantes para estudios futuros asociados a la descripción de nuevos fármacos contra la leucemia mieloide crónica.

Comissão: Fabíola Attié de Castro
Eliane Candiani Arantes Braga
Denise Crispim Tavares

Aluno: Willian Abraham da Silveira

Orientador: Marcelo Dias Baruffi

Defesa: 01/07/2011

Título: Avaliação da interação entre galectina-1 e zinco e suas potenciais implicações estruturais e funcionais

Title: Evaluation of the interaction between Galectin-1 and Zinc and their potential structural and functional implications.

Título: Evaluación de La interacción entre la Galectina-1 y el Zinc y sus potenciales implicaciones estructurales y funcionales

Resumo: Introdução: A Galectina-1 (Gal-1) é uma proteína multifuncional capaz de reconhecer, de modo específico, glicanas compostas por resíduos de -galactosídeos, por meio de domínios de reconhecimento de carboidrato (CRD). A Gal-1 é um homodímero de 14.900 daltons, $pI = 5.6$, apresenta uma topologia molecular do tipo jelly-roll composto por duas folhas-anti-paralelas. Além disso, esta proteína não apresenta peptídeo sinal e possui 6 cisteínas, 7 ácidos glutâmicos, 9 ácidos aspárticos e 4 histinas por monômero. A Gal-1 liga-se a diferentes moléculas biológicas contidas nas superfícies celulares, núcleo e componentes da matriz extracelular. O zinco é um importante metal em sistemas biológicos. Aproximadamente 10% do proteoma humano é potencialmente capaz de complexar zinco. Este íon exibe propriedades adequadas tanto para funções catalíticas, quanto estruturais em proteínas. Os sítios de ligação a zinco, nas proteínas, podem ser divididos em catalíticos, estruturais, co-catalíticos e sítios na interface protéica. Geralmente, os resíduos de cisteína, histidina, ácido glutâmico e ácido aspártico são alvos preferenciais de interação com Zn. Há na literatura dados que mostram a interação da Gal-1 humana com íons orgânicos, porém não há relatos sobre a interação Gal-1/Zn. Objetivos: O presente trabalho teve como objetivo avaliar a existência e as implicações da interação entre o íon Zn^{2+} e a proteína Gal-1. Materiais e Métodos: Foi efetuada a produção, purificação e padronização do uso das formas dimerica e monomérica da Gal-1 recombinante humana. A interação Gal-1/Zn foi avaliada através de ensaios biofísicos e biológicos. A análise *in vitro* e *in silico* dos parâmetros biofísicos, foi feita através de espectrofluorimetria, de dicroísmo circular, de ensaio de precipitação, do método GRID e por dinâmica molecular. A análise *in vitro* dos parâmetros biológicos, foi realizada por meio de ensaio de hemaglutinação e interação com laminina por ELISA. Resultados e Discussão: A adição de $ZnCl_2$ numa solução de Gal-1 causa aumento da emissão por fluorescência do triptofano e uma alteração para o vermelho, altera o espectro de dicroísmo circular e causa precipitação protéica da Gal-1. Estes eventos ocorreram de forma seletiva e dependente da concentração desse íon. As análises *in silico* indicam que o provável sítio de complexação Zn/Gal-1 é distinto do CRD e é formado pelos aminoácidos Glu-15, Asp-92 e Asp-134, assumindo a conformação trigonal bipiramidal e tendo número de coordenação igual a 5. Conclusão: As análises biofísicas *in vitro* e *in silico*, nos indicam que a Galectina-1 tem a capacidade de se complexar com o íon Zn^{2+} .

Summary: Introduction: Galectin-1 (Gal-1) is a multifunctional protein that specifically recognizes glycans with -galactosides through carbohydrate recognition domains (CRD). Gal-1 is a homodimeric protein of 14.900daltons, $pI=5.6$, shows a jelly-roll molecular topology composed of two anti-parallel - sheet, has no signal peptide and contains 6 cysteines, 7 glutamic acids, 9 aspartic acids and 4 histidines per monomer. This lectin binds to different biological molecules contained in the cell surface, nucleus and extracellular matrix components. Zinc is an important metal in biological systems because can participate in the maintenance of protein structure and biological activity. Usually, cysteine, histidine, glutamic acid and aspartic acid residues are preferential targets for interaction with Zn. Approximately 10% of the human proteome is potentially capable of forming complexes with Zn. The Zn^{2+} ion exhibits properties suitable for both catalytic and structural protein functions. Proteins zinc binding sites can be divided into catalytic, structural, co-catalytic and protein interface sites. There are reports in the literature that shows the interaction between galectin-1 and organic ions. However, were not found reports about Zn-Gal-1 complexes. Objective: The aim of this study was to evaluate the existence and implications of the interaction between galectin-1 and Zn^{2+} ion. Materials and Methods: Human recombinant Gal-1 (monomer and

dimmer) was obtained and purified. Also, the conditions for the use of Gal-1 were standardized. The interaction Zn/Gal-1 was assessed by biophysical and biological procedures. The analysis in vitro and in silico was made by spectrofluorimetry, circular dichroism, precipitation test, method of GRID, and molecular dynamics. The in vitro analysis of biological parameters were performed by hemagglutination and laminin binding (ELISA) tests. Results and Discussion: The addition of ZnCl₂ in Gal-1 solution causes increased fluorescence emission of tryptophan-70 and a red shift, alters the circular dichroism spectrum and causes precipitation of Gal-1 protein. These events occurred in a selective manner dependent of Zinc concentration. The in silico analysis indicates that the probable site of Zn/Gal-1 complexation is distinct from the CRD and is formed by the amino acids Glu-15, Asp-92 and Asp-134, assuming trigonal bipyramidal conformation and with coordination number equal to 5. Conclusion: The biophysical in vitro and in silico findings suggests that Galectin-1 has the ability to complex with the Zn²⁺ ion.

Resumen: Introducción: La Galectina-1 (Gal-1) es una proteína multifuncional capaz de reconocer, de modo específico glicanas compuestas por residuos de β-galactosídeos por medio de dominios de reconocimiento de carbohidrato (CRD). La Gal-1 es un homodímero de 14.900 dalton, pI = 5.6, que presenta una topología molecular del tipo “jelly-roll” compuesto de dos hojas-β antiparalelas. Además, esta proteína no presenta péptido señal y posee 6 cisteínas, 7 ácidos glutámicos, 9 ácidos aspárticos y 4 histidinas por monómero. La Gal-1 se liga a diferentes moléculas biológicas contenidas en las superficies celulares, núcleo y componentes de la matriz extracelular. El zinc es un importante metal en sistemas biológicos. Aproximadamente 10% del proteoma humano es potencialmente capaz de acomplejar el zinc. Este ion exhibe propiedades adecuadas tanto para funciones catalíticas cuanto estructurales en proteínas. Los sitios de ligazón al zinc en las proteínas, pueden ser divididos en catalíticos, estructurales, cocatalíticos y sitios en la interfaz proteica. En general, los residuos de cisteína, histidina, ácido glutámico y ácido aspártico son los blancos preferenciales de interacción con el Zn. En la literatura hay datos que muestran la interacción de la Gal-1 humana con los iones orgánicos, pero no hay reportes sobre la interacción Gal-1/Zn. Objetivos: El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la existencia y las implicaciones de la interacción entre el ion Zn²⁺ y la proteína Gal-1. Materiales y Métodos: Fue efectuada la producción, purificación y padronización del uso de las formas dimerica y monomérica de la Gal-1 recombinante humana. La interacción Gal-1/Zn fue evaluada por medio de ensayos biofísicos y biológicos. Los análisis – in vitro e in silico – de los parámetros biofísicos, fueron hechos por medio de espectrofluorimetría, de dicroísmo circular, de ensayo de precipitación, del método GRID y por dinámica molecular. El análisis in vitro de los parámetros biológicos, fue realizado por medio de ensayo de hemaglutinación e interacción con laminina por ELISA. Resultados y Discusión: El adición de ZnCl₂ en una solución de Gal-1 causa aumento de la emisión por fluorescencia del triptófano y una alteración para el rojo altera el espectro de dicroísmo circular y ocasiona precipitación proteica de la Gal-1. Estos eventos ocurrieron de forma selectiva y dependiente de la concentración de ese ion. Los análisis in silico indican que el probable sitio de acomplejación Zn/Gal-1 es distinto del CRD y es formado por los aminoácidos Glu-15, Asp-92 y Asp-134, asumiendo la conformación trigonal bipyramidal y teniendo número de coordinación igual a 5. Conclusión: Los análisis biofísicos in vitro e in silico nos indican que la Galectina-1 tiene la capacidad de acomplejarse con el ion Zn²⁺.

Comissão: Marcelo Dias Baruffi
Maria Cristina Nonato Costa
Roberto Ruller