



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

MESTRADO – 2014

Aluno: Ana Flavia Tonelli Fernandes

Orientador: Eliana Guedes Stehling

Defesa: 14/02/2014

Título: Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas* spp. envolvidas na biodegradação da atrazina

Title: Phenotypic and molecular characterization of *Pseudomonas* spp. strains involved in atrazine degradation

Resumo: A atrazina é um herbicida amplamente utilizado no Brasil e no mundo em diferentes culturas agrícolas, principalmente em culturas de milho, sorgo, soja e cana-de-açúcar, entretanto, pode se tornar um contaminante de águas superficiais e subterrâneas e do solo, gerando uma preocupação ambiental, pois desequilibra e interfere no ecossistema. A atrazina pode sofrer biodegradação, tornando o processo de biorremediação uma alternativa viável e ecologicamente aceitável para o tratamento de ambientes contaminados por esse herbicida. O microrganismo de referência nesse processo de biodegradação é a *Pseudomonas* sp. ADP que possui o plasmídeo pADP-1, no qual se localizam os genes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* e *atzF*, que codificam enzimas atuantes na via de degradação da atrazina. O presente estudo teve como objetivo o isolamento e a caracterização de bactérias do gênero *Pseudomonas* quanto à presença de genes de degradação da atrazina e quanto à capacidade de degradação desse herbicida. No presente trabalho foram isoladas 123 cepas de amostras de solo de diferentes regiões do Brasil, as quais foram caracterizadas através de provas bioquímicas e moleculares e identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* (74,8%) e outras espécies (25,2%) pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Cupriavidus* e *Rhizobium*. A variabilidade genética dos isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foi analisada através da técnica de ERIC-PCR e demonstrou que todos os isolados apresentam alta diversidade genética (<80%). Os genes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* e *atzF* foram detectados em seis isolados provenientes de amostras de solo das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, sendo três deles da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, um *Cupriavidus pauculus*, uma *Burkholderia cepacea* e um *Rhizobium radiobacter*. Apenas três isolados contendo os genes *atz* apresentaram plasmídios. Os isolados bacterianos que apresentaram os genes *atz* foram testados quanto à capacidade de crescimento utilizando a atrazina como única fonte de nitrogênio e quanto à capacidade de degradação desse herbicida. Todos os isolados testados apresentaram crescimento em meio ATZ-R, mas não foi possível observar a mineralização do herbicida, tanto em meio sólido quanto em meio líquido, todavia observou-se a degradação da atrazina por uma espécie de *Pseudomonas aeruginosa* (isolado P86), com redução de 44%, em meio líquido ATZ-R contendo 33 ppm de atrazina.

Summary: Atrazine - the herbicide widely used in Brazil and all over the world in different agricultural crops mainly in corn, sorghum, soy, and sugar cane can contaminate the superficial and subterranean water, and soil creating an environmental concern due to imbalance and interference caused in ecosystem. Atrazine can suffer biodegradation, which can make the bioremediation process a viable and ecologically acceptable alternative for the treatment of the environment contaminated with this herbicide. The microorganism referred on that biodegradation process is *Pseudomonas* sp. ADP which has pADP-1 plasmid, where are the genes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, and *atzF* that codify active enzymes on atrazine degradation way. The aim of this present study was the isolation and the characterization of

Pseudomonas genus bacteria due to the presence of the atrazine degradation genes, and the capacity of degradation of this herbicide. In the present work 123 samples of soil bacteria from different Brazilian regions were isolated, and characterized by biochemical and molecular tests, and identified as *Pseudomonas aeruginosa* (74.8%) and other species (25.2%) of *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* genus. Genetic variability of the isolated of *Pseudomonas* genus was analyzed by the ERIC-PCR technique, and demonstrate that all the isolated ones presented high genetic diversity (<80%). *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, and *atzF* genes were detected in six isolated of soil samples from North, Northeast, Southeast, and Midwest of Brazil being 3 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Cupriavidus pauculus*, 1 *Burkholderia cepacea*, and 1 *Rhizobium radiobacter*. Only 3 isolated with *atz* genes presented plasmids. Bacterial isolates that presented *atz* genes were tested for growth and degradation capacity using only atrazine as nitrogen source. All tested isolates presented growth on ATZ-R, but mineralization of this herbicide in solid or liquid media was not possible to observe. However, 1 specie *Pseudomonas aeruginosa* (isolate P86) presented atrazine degradation (reduction of 44%) in ATZ-R liquid media with 33 ppm of atrazine.

Comissão: Eliana Guedes Stehling
Maria Bernadete Amancio Varesche Silva
Hamilton Cabral

Aluno: Maira da Costa Cacemiro

Orientador: Fabiani Gai Frantz

Defesa: 14/02/2014

Título: Estudo de biomarcadores imunológicos das funções de monócitos derivados de pacientes HIV+

Title: Study of immunological biomarkers of functions of monocytes derived from HIV + patients

Resumo: O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o responsável pela pandemia mundial da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Uma vez infectado pelo HIV, o hospedeiro apresenta a forma aguda da doença, caracterizada por aumento da carga viral circulante, rápido declínio das células TCD4+ e ativação da resposta imune inata. Quando o HIV se estabelece no organismo, induz latência em algumas células e leva à cronicidade da infecção e nessa fase o principal alvo do HIV são as células T CD4+, observa-se então constante diminuição desta população, que tem como consequência a imunodeficiência, com desativação de outras células imunes, como os monócitos, macrófagos, células Natural Killer e neutrófilos. Portanto, há o favorecimento das infecções oportunistas por fungos, bactérias, parasitas e outros vírus, além do surgimento de neoplasias principais responsáveis pela morbidade e mortalidade relacionadas à AIDS. Para conter a destruição do sistema imune pelo vírus, inicia-se a terapia antirretroviral (TARV), sendo que o parâmetro disponível na clínica para início da terapia é a carga viral e contagem de células TCD4+. Neste sentido, investigamos se fatores relacionados à função e fenótipo de monócitos de pacientes HIV+ poderiam servir como biomarcadores da progressão da infecção. Para tanto, monócitos provenientes do sangue periférico de indivíduos HIV+, virgens ou não de tratamento e de indivíduos controle foram ou não infectadas *in vitro* com *Salmonella* Enteritidis. A capacidade fagocítica, a atividade microbicida, a produção de óxido nítrico (NO) e de citocinas foi avaliada e para avaliar a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), os monócitos foram ainda estimulados ou não com PMA. Concluímos que a infecção pelo HIV leva ao aumento da capacidade fagocítica de monócitos de homens quando comparados à mulheres nas mesmas condições, entretanto a infecção não altera funções como a atividade microbicida, produção de EROs ou NO, entretanto, o perfil de citocinas entre os grupos foi muito diferente, entretanto o uso de TARV é capaz de recuperar parcialmente as correlações formadas entre citocinas comparadas ao grupo controle. Desta forma uma bioassinatura funcional poderia ser descrita, tendo como base a produção diferencial de citocinas e quimiocinas, como IL-1 β , IL-6 e IL-12p70.

Summary: The human immunodeficiency virus (HIV) is the responsible for the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) global pandemic. Once infected with HIV, the host has an acute form of the disease, characterized by a very high circulating level of virus and a rapid decline in CD4+ T cells, and then, the activation of innate immune response. The HIV is established in the body, inducing latency in some cells and leads to chronic infection, phase which the main target of HIV are the CD4+ T cells, and then what we observe is the constant decline of this population, which brings the immunodeficiency as a consequence, characterized by the deactivation of other immune cells, such as monocytes, macrophages, natural killer and neutrophils. In this way, opportunistic infections by fungal, bacteria, parasites and others viuses in addition to the neoplasm are established, being the main responsible for the morbidity and mortality related to AIDS. To contain the immune system destruction by the virus, the antiretroviral therapy (HAART) can be initiated, and the clinical parameter available considered to the onset of therapy to is the viral load and CD4+ T cell counts. In this sense, we have investigated if the factors related to the function and phenotype of monocytes from HIV+ patients could serve as biomarkers of the progression of infection. To this end, monocytes from the peripheral blood of HIV+ patients treated or not with HAART and control subjects were infected or not *in vitro* with *Salmonella* Enteritidis. The phagocytic capacity, microbicidal activity, the production of nitric oxide (NO) or cytokines were evaluated and when monocytes were stimulated or not with PMA, the production of reactive oxygen species (ROS) was evaluated. We conclude that HIV infection leads to

increased phagocytic ability of monocytes of men compared to women in the same conditions, however, the infection does not alter functions such as microbicidal activity and ROS and NO production, however, the cytokine profile between groups was very different, however the use of HAART is able to partially recover the correlations formed between cytokines compared to the control group. Thus a functional biosignature could be described based on the differential production of cytokines and chemokines such as IL-1 β , IL-6 and IL-12p70.

Comissão: Fabiani Gai Frantz
Mario Leon Silva Vergara
Emiliana Pereira Abrão da Costa

Aluno: Felipe Henrique Zuccolotto dos Reis

Orientador: Luciane Carla Alberici

Defesa: 17/04/2014

Título: Efeitos da triacsin C e da clusianona no metabolismo energético de mitocôndrias e células hepáticas isoladas de rato

Title: Effects of triacsin C or clusianone on energy metabolism of mitochondria and isolated rat liver cells

Resumo: Introdução e objetivos: Tem sido demonstrado que um moderado desacoplamento mitocondrial em células hepáticas pode reverter a hipertrigliceridemia, a doença de fígado gorduroso e a resistência à insulina. A dissipação da energia conservada no espaço intermembranas mitocondrial, como ocorre no desacoplamento, aumenta o uso de substratos energéticos e também podem reduzir a geração mitocondrial de espécies reativas de O₂ (EROs). Duas estratégias de desacoplamento mitocondrial foram estudadas neste trabalho: a primeira consistiu em reduzir a velocidade da via de síntese de triacilgliceróis por meio da triacsin C (inibidor da Acil CoA Sintetase - ACS), e dessa forma aumentar os ácidos graxos livres (AGL) como substratos das proteínas desacopladoras; a segunda foi verificar se clusianona (composto natural das raízes de *Clusia congestiflora*), análogo estrutural do desacoplador químico nemorosoma, é capaz de promover o desacoplamento químico. Resultados e discussão: A triacsin C, em concentrações até 1 µM, não apresentou efeito tóxico em mitocôndrias isoladas de fígado e nem em hepatócitos primários. Nesses últimos, aumentou o consumo de oxigênio nos estados de respiração basal e de máxima velocidade respiratória. Além disso, foi verificado um aumento da expressão do fator de transcrição PGC1- alfa e de β-hidroxiacil CoA desidrogenase (HAD), uma enzima da beta-oxidação de ácidos graxos. A clusianona aumentou o consumo de O₂ no estado de repouso, diminuiu o potencial de membrana, reduziu a produção de EROs e preveniu o inchamento mitocondrial induzido por Ca²⁺ de forma dose dependente, porém menos potente que a nemorosona. Conclusões: Nossos resultados indicam que a triacsin C acelerou o metabolismo mitocondrial, a oxidação de ácidos graxos e a biogênese mitocondrial; a clusianona foi caracterizada como um desacoplador eficaz da fosforilação oxidativa mitocondrial, provavelmente envolvendo um mecanismo protonofórico devido as suas propriedades químicas. Dessa forma, ambas as estratégias estudadas se mostram com potencial terapêutico no tratamento de doenças como esteatose hepática, hipertrigliceridemia e obesidade.

Summary: Introduction and Objectives: It has been shown that a mild mitochondrial uncoupling in livers can reverse hypertriglyceridemia, fatty liver disease and insulin resistance. The dissipation of energy stored in mitochondrial intermembrane space as heat, as in uncoupling, increases the use of energy substrates and may also reduce the mitochondrial generation of reactive O₂ species (ROS). Two strategies to induce mitochondrial uncoupling were studied in this work: the first consisted of slowing down the route of triacylglycerols synthesis by triacsin C (acyl CoA synthetase inhibitor), and thus increasing the free fatty acids (FFA) as substrates for uncoupling proteins; the second was to determine whether clusianone (natural compound from the roots of *Clusia congestiflora*), a structural analogue of chemical uncoupler nemorosoma, is capable of promoting the chemical uncoupling. Results and discussion: The triacsin C, in concentrations up to 1 µM, showed no toxic effect on liver mitochondria and primary hepatocytes. In hepatocytes triacsin C increased oxygen consumption in the states of basal respiration and maximum respiratory rate. In addition, there was an increase in the expression of the transcription factor PGC1 - α and β - hydroxyacyl CoA dehydrogenase (ADH), an enzyme of β- oxidation of fatty acids. The clusianone increased O₂ consumption in resting state, decreased membrane potential, reduced the production of ROS and prevented the mitochondrial swelling induced by Ca²⁺ in a dose dependent manner, but less potent than nemorosone. Conclusions: Our results indicate that triacsin C accelerated mitochondrial metabolism, fatty acid oxidation and mitochondrial biogenesis; the clusianone was characterized as an effective uncoupler of mitochondrial oxidative phosphorylation, probably

involving a protonoforic mechanism due to its chemical properties. Therefore, both strategies have therapeutic potential in the treatment of diseases such as liver steatosis, hypertriglyceridemia and obesity.

Comissão: Luciane Carla Alberici
Antonio Cardozo dos Santos
Tiago Rezende Figueira

Aluno: Adriana Moreira Soares

Orientador: Victor Hugo Aquino Quintana

Defesa: 06/06/2014

Título: Caracterização molecular dos vírus da dengue isolados em Ribeirão Preto de 2010 a 2011

Title: Molecular characterization of dengue virus isolated in Ribeirão Preto in 2010 and 2011

Resumo: A dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus da dengue (DENV) e transmitida principalmente pela picada de mosquitos *Aedes aegypti*. A dengue é a doença viral transmitida por artrópodes de maior importância em saúde pública, afetando principalmente a países tropicais e subtropicais do mundo. As epidemias de dengue têm aumentado consideravelmente nos últimos anos em todo o mundo e as fronteiras de circulação do vírus vem se expandido constantemente. Assim, estudos de diferentes aspectos da doença e do vírus são de grande importância para aperfeiçoar os conhecimentos sobre esta ameaça. Neste sentido, é importante que algumas análises, como as filogenéticas e evolutivas dos vírus sejam realizadas para identificação dos genótipos circulantes, a origem dos mesmos, o relacionamento com outros subtipos e a evolução sofrida ao longo do tempo. Este estudo teve por objetivo analisar o relacionamento filogenético e evolutivo dos DENV isolados em Ribeirão Preto entre 2010 e 2011. Amostras de soro (n=79) de pacientes com dengue estocadas a -80°C foram inoculadas em células C6/36 para tentativa de isolamento viral, o qual foi confirmado a partir de 39 amostras por imunofluorescência indireta e/ou RT-PCR em tempo real. Sequenciamento de parte do gene da proteína viral NS5 ou do gene da proteína E mostrou que 25 pertenciam ao DENV-1, seis ao DENV-2 e oito ao DENV-3. Para as análises filogenéticas e evolutivas, o gene da proteína E de 15 DENV-1, quatro DENV-2 e um DENV-3 foi sequenciado. Estas análises foram realizadas também utilizando toda a região codificadora de dois DENV-1, um DENV-2 e um DENV-3. As análises mostraram que todos os vírus introduzidos em Ribeirão Preto foram provenientes de vírus originados no Estado do Rio de Janeiro. Duas linhagens de DENV-1, uma de DENV-2 e uma de DENV-3 circularam em Ribeirão Preto entre 2010 e 2011. O relacionamento filogenético dos vírus foi similar independentemente do uso da sequência do gene da proteína E ou de toda a região codificadora.

Summary: Dengue is an infectious disease caused by dengue virus (DENV) and transmitted mainly by *Aedes aegypti* mosquitoes. Dengue is the viral disease transmitted by arthropods of greater importance in public health, particularly affecting the tropical and subtropical countries of the world. Dengue epidemics have increased considerably in recent years throughout the world and the borders of virus circulation have been expanding constantly. Thus studies of different aspects of the disease and the virus are of great importance to improve knowledge about this threat. In this sense, it is important that some analyzes such as phylogeny and evolution be carried out to identify the circulating genotypes, their origin, their relationship with other subtypes and evolution along the time. This study aimed to analyze the phylogenetic and evolutionary relationships of DENV isolated in Ribeirão Preto between 2010 and 2011. Serum samples (n = 79) of dengue patients stored at -80°C were inoculated into C6/36 cells for virus isolation attempts, which was confirmed from 39 samples by indirect immunofluorescence and/or real-time RT-PCR. Sequencing of part of the viral NS5 gene protein or the E gene protein showed that 25 belonged to DENV-1, six to DENV-2 and eight to DENV-3. For the phylogenetic and evolutionary analyzes, the E gene protein of 15 DENV-1, four DENV-2 and one DENV-3 was sequenced. These analyzes were also carried out with the entire coding region of two DENV-1, one DENV-2 and one DENV-3. The analysis showed that all viruses were introduced in Ribeirão Preto from viruses originated in the state of Rio de Janeiro. Two lineages of DENV-1, one of DENV-2 and one of DENV-3 circulated between 2010 and 2011. The phylogenetic relationship of these viruses was similar regardless of the use of the E gene protein or the entire coding region sequences.

Comissão: Victor Hugo Aquino Quintana
Eurico de Arruda Neto

Adriano Mondini

Aluno: Fillipe Luiz Rosa do Carmo

Orientador: Elisa Maria de Sousa Russo

Defesa: 03/09/2014

Título: Clonagem, expressão e caracterização do fator estimulador de colônia de granulócito humano recombinante (rhG-CSF) em *Escherichia coli*

Title: Cloning, expression and characterization of the colonystimulating factor recombinant human granulocyte (rhG-CSF) in *Escherichia coli*

Resumo: O sistema de expressão em *Escherichia coli* foi o primeiro a ser utilizado para produzir produtos farmacêuticos recombinantes e tem muitas vantagens quando comparado com sistemas eucarióticos, como o fácil cultivo, baixo custo e alto potencial de produção. O fator estimulador de colônias de granulócito (G-CSF) atua principalmente promovendo a maturação dos neutrófilos e estimulando sua atividade fagocítica e quimiotática, além de estar envolvido com o processo de segmentação nuclear dessas células. O fator estimulador de colônias de granulócitos humano recombinante (rhG-CSF) tem sido produzido por engenharia genética em *Escherichia coli*, e é usado no tratamento de diversas patologias, sobretudo em neutropenias provocadas pela quimioterapia usada no tratamento de tumores, pela radioterapia e pelo uso de drogas que suprimem a produção de células mieloides. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo a expressão da proteína rhGCSF em bactérias *Escherichia coli*. A clonagem do gene rhG-CSF no vetor de expressão pET-28a(+) foi realizada nos sítios de restrição das enzimas EcoRI e XhoI, e a expressão da proteína recombinante em cepas de bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 foi obtida com sucesso. A proteína rhG-CSF, fundida à cauda de seis histidinas, foi purificada com êxito e identificada pelas técnicas de *Western Blotting* e por espectrometria de massas. São necessários estudos para avaliar a integridade estrutural e atividade biológica da proteína produzida, que se confirmada, possibilita que esta seja produzida em escala piloto.

Summary: The expression system in *Escherichia coli* was the first to be used to produce recombinant pharmaceuticals and has many advantages compared to eukaryotic systems, such as easy cultivation and high production potential at low costs. The granulocyte colony (G-CSF) stimulating factor acts primarily by promoting the maturation of neutrophils and stimulating their phagocytic and chemotactic activity. G-CSF is also involved with the process of neutrophils nuclear segmentation. The recombinant human granulocyte colonies stimulating factor (rhG-CSF) has been produced by genetic engineering in *Escherichia coli*, and it is used to treat of several conditions, especially neutropenia caused by chemotherapy used in the treatment of tumors, by radiotherapy and by the use of drugs that suppress the production of myeloid cells. The present study aimed the expression of rhG-CSF protein in *Escherichia coli* bacteria. The cloning of rhG-CSF gene in the expression vector pET- 28a (+) was carried out on the restriction sites of the EcoRI and XhoI enzymes. Expression of the recombinant protein in *Escherichia coli* BL21DE3 was successfully achieved. The rhG-CSF protein, fused with a six histidine tag, was obtained and successfully purified and identified by the *Western Blotting* and by mass spectrometry techniques. Studies are needed to assess the structural integrity and biological activity of the protein produced, which, if confirmed, enables the production on a pilot scale.

Comissão: Elisa Maria de Sousa Russo
Taísa Magnani Dinamarco
Hamilton Cabral

Aluno: Gisele Bulhões Portapilla

Orientador: Sérgio de Albuquerque

Defesa: 26/09/2014

Título: Determinação do potencial tripanocida de derivados do ácido copálico

Title: Trypanocidal potential of copalic acids derivatives

Resumo: A doença de Chagas é uma das principais Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) e considerada um importante problema de saúde pública, pois acomete milhares de pessoas e outras, permanecem expostas ao risco de infecção. É descrito que as terapias disponíveis baseadas no benzonidazol e nifurtimox, provocam severos efeitos colaterais, além de possuírem baixa eficácia durante a fase crônica da doença. Estudos fitoquímicos relatam que o oleoresina de copaíba, extraído de árvores do gênero *Copaífera*, é constituído por diversos terpenos que apresentam alta atividade e seletividade contra *Trypanosoma cruzi*. Portanto, na busca de moléculas alternativas para tratamento dessa patologia, o objetivo deste trabalho consistiu em determinar o potencial tripanocida *in vitro* de derivados semissintéticos, obtidos a partir dos terpenos óxido de cariofileno e ácido copálico. O ácido copálico foi obtido por métodos cromatográficos, porém devido às dificuldades encontradas durante a execução do trabalho, não foram obtidos derivados semissintéticos a partir dessa substância embora, algumas das metodologias propostas proporcionaram a obtenção do diterpeno ácido 19-*ent*-cauranóico, pouco descrito na literatura. As reações de síntese para o óxido de cariofileno resultaram em oito derivados semissintéticos (**D1** a **D8**). Logo, no presente trabalho foram determinadas as atividades biológicas *in vitro* dos seguintes compostos: óleo de copaíba, ácido 19-*ent*-cauranóico, ácido copálico, óxido de cariofileno, os derivados **D1** a **D7** e benzonidazol. **D8** foi instável a presença de luz. A atividade citotóxica dos compostos foi avaliada sobre a linhagem celular de mamífero LLC-MK2 e os ensaios tripanocidas, obtidos sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas Y e Bolívia. Todas as substâncias apresentaram citotoxicidade moderada, porém as modificações estruturais em **D1**, **D2**, **D3** foram importantes por reduzir o efeito tóxico sobre células LLC-MK2. Os derivados semissintéticos do óxido de cariofileno apresentaram maior atividade sobre as formas evolutivas de *T. cruzi* quando comparados ao produto bruto. Além disso, a ação da maioria dessas substâncias demonstrou ser mais seletiva para os parasitos do que para células de mamífero. Deve-se destacar que a estrutura química de **D3** mostrou-se promissora, pois os resultados indicaram que o derivado foi efetivo tanto para reduzir a citotoxicidade quanto por ser ativo para ambas as formas das cepas Y e Bolívia. Os dados obtidos neste trabalho confirmam a efetividade da química orgânica sintética como um mecanismo ímpar para potencializar a ação de substâncias terapêuticamente úteis, de modo que estudos posteriores serão realizados a fim de determinar a atividade desses novos compostos em protocolos *in vivo*, bem como determinar os possíveis mecanismos de ação dos mesmos, sobre estruturas biológicas ou rotas metabólicas do protozoário *T. cruzi*.

Summary: Chagas' disease is one of the most important tropical neglected diseases in global public health, affecting thousands of people, and exposing other ones to the infection risk. According to the literature, therapies with benznidazole and nifurtimox cause serious side effects, and show low efficacy during the chronic phase of the disease. Phytochemical studies showed that copaiba oils obtained from threes of *Copaífera* genus present several terpenes that show high activity and selectivity against *Trypanosoma cruzi*. In order to search alternative molecules for this treatment, the aim of this study was to determine the *in vivo* potential trypanocidal effect of semisynthetic derivatives obtained by the terpenes caryophyllene oxide and copalic acid. We obtained copalic acid by chromatographic methods but due some difficulties during the procedure, we could find no semisynthetic derivatives from this substance besides, some purposed methodologies allowed the obtaining of the diterpene acid 19-*ent*-cauranic that was not commonly described on the literature. The synthesis reactions for caryophyllene oxide resulted in eight semisynthetic derivatives (**D1** to **D8**). So, we could determine the *in vivo* biological activities of the following compounds: copaiba oil, acid 19-*ent*-cauranic, copalic acid, caryophyllene oxide, **D1** to **D8** derivatives,

and Benznidazole. **D8** was unstable in the presence of light. Cytotoxic activities of the compounds were evaluated by cellular mammal strain LLC-MK2 and trypanocidal activity assays, obtained from epimastigotes and trypomastigotes forms of Bolivia and Y strains. All the substances showed high activity on the evolutive forms of *T. cruzi* when compared with the row product. Besides, the action of great part of the substances has been shown more selectivity for parasites than the mammals' cells. The test results of chemical structure of **D3** showed that its derivative was effective for both cases reducing the toxicity, and being active for Bolivia and Y strains. Obtained data confirmed the effectiveness of the synthetic organic chemistry as a very important way to increase the action of substances therapeutically so useful that posterior studies will be accomplished in order to determine the activity of these new *in vivo* compounds protocols, as well as to indicate its possible action mechanisms on biological structures or metabolic routes of the protozoa *T. cruzi*.

Comissão: Sérgio de Albuquerque
Clovis Wesley Oliveira de Souza
Niego Araçari Jacometti Cardoso Furtado

Aluno: Murilo Rodrigues Barbosa de Freitas

Orientador: Ana Amélia Carraro Abrahão

Defesa: 26/09/2014

Título: O efeito do selênio em ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Title: The selenium effects in pregnant rats infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*

Resumo: O selênio (Se) é um micronutriente importante na dieta de mamíferos e tem sido descrito com importante papel na função imune. É constituinte de mais de 25 selenoproteínas na forma do aminoácido selenocisteína, sendo este elemento crítico na manutenção do sistema de defesa antioxidante. Uma dieta complementar com Se pode ser benéfica no tratamento de doenças correlacionadas com altos níveis de estresse oxidativo, como a doença de Chagas, enfermidade negligenciada causada por *Trypanosoma cruzi*. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do Se em ratas Wistar prenhas infectadas pela cepa Y de *T. cruzi*. O tratamento com Se desencadeou aumento no peso e comprimento fetal, bem como no diâmetro e peso placentário. Também foi observada diminuição da parasitemia. Não ocorreram alterações significativas nas concentrações de NO e no número de ninhos de amastigotas no coração. A avaliação histológica das placentas mostrou elevado número de ninhos de amastigotas nos animais do grupo infectado e tratado. A redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias e de populações de células T desencadeou uma resposta voltada ao padrão Th-2, característico da gestação, fato que provavelmente contribuiu no aumento do parasitismo placentário encontrado nos animais tratados com Se. Além disso, muitos estudos demonstram que as doses tóxicas de selênio são ligeiramente acima dos requisitos homeostáticos (Zhang et al., 2014). Assim, é possível que a administração de Se, durante a prenhez, poderia alterar a resposta imune placentária local, favorecendo a instalação do parasita. Mais estudos são necessários para avaliar a interação entre o Se e a doença de Chagas durante a prenhez.

Summary: The selenium (Se) is an essential micronutrient in the diet of mammals and has an important role in the immune function. A range of 25 selenoproteins has its structure and most of them in the form of amino acid selenocysteine, being this element involved in the maintenance of the antioxidant defense. Diet with Se is beneficial in the treatment of diseases correlated with high levels of oxidative stress, like Chagas' disease, a neglected illness caused by *Trypanosoma cruzi*. The objective of this study was to evaluate the effects of selenium in the immune response of pregnant Wistar rats infected with the Y strain of *T. cruzi*. Se treatment triggered enhanced fetal weight and length and placental diameter and weight. It was observed decreased parasitemia. No significant alterations in NO concentrations and amastigote nests in heart were observed. The histological evaluation of placenta displayed an enhanced number of amastigote nests in infected and Se treated animals. The reduction of pro-inflammatory cytokines and T cell populations triggered a Th-2 immune response, which is the hallmark of the gestation period. This fact probably led to the raise in parasite nests in placenta of infected and Se treated animals. Furthermore, this enhanced number of amastigote nests found in placenta may be due to the fact that the toxic doses of Se are at levels slightly above homeostatic requirements (Zhang et al., 2014). So it is possible that the Se supplementation during pregnancy could impair the local placental immune response. Further studies are needed to assess the interaction between selenium and the acute Chagas' disease during pregnancy.

Comissão: Ana Amélia Carraro Abrahão
Lusania Maria Gregg Antunes
Angelita Maria Stabile

Aluno: Vitor Francisco dos Santos

Orientador: Sergio Akira Uyemura

Defesa: 26/09/2014

Título: Estudo das alterações da parede celular durante ativação de mecanismos de defesa em *Momordica charantia* como fator de produção de metabólitos secundários bioativos

Title: Study of cell wall changes during activation of defense mechanisms in *Momordica charantia* as factor of production of bioactive secondary metabolites

Resumo: *Momordica charantia* é uma espécie de planta pertencente à família Cucurbitaceae. No Brasil, é conhecida pelo nome popular de Melão de São Caetano. É encontrada em grande parte do globo terrestre, sendo que no Brasil é observada nas regiões litorâneas e principalmente nas regiões do interior do país. Escolhemos o estudo com *Momordica charantia* devido suas propriedades terapêuticas conhecidas serem de grande interesse. Ela vem ganhando cada vez mais reconhecimento através de pesquisas científicas realizadas, visto que, já é utilizada a milhares de anos através da cultura popular. Tais pesquisas têm confirmado e entendido cada vez mais as propriedades medicamentosas desta planta e os mecanismos responsáveis por tais funções nesta espécie, sendo as propriedades antidiabéticas, antivirais e anticancerígenas as de maior destaque. Os experimentos realizados em torno da *Momordica charantia*, na busca destes compostos foram todos realizados utilizando extratos retirados dos próprios tecidos já diferenciados na planta adulta (sementes, folhas, raízes e frutos). Neste trabalho, foi realizado a pesquisa de metabólitos secundários produzidos pela cultura de células em suspensão de *Momordica charantia* durante a fase de crescimento desta e após a realização de ensaios de elicitação com Ácido Salicílico (AS). Nosso laboratório vem se dedicando aos estudos da composição da parede celular vegetal e suas alterações, bem como dos mecanismos de defesa empregados pelas células em suspensão em condições de estresse biótico e abiótico. O ácido salicílico é um dos hormônios vegetais envolvido em vários mecanismos de respostas que envolve o estresse vegetal e de desenvolvimento da planta tais como o de garantir resistência a patógenos por exemplo. Quando ocorre algum processo de infecção ou lesivo para a planta, ocorre um aumento na concentração de AS no interior da planta. Esse aumento leva a ativação de certas vias metabólicas que culminam na produção de metabólitos secundários e na degradação, fragmentação ou espessamento da parede celular. Como resposta dos ensaios de elicitação realizados podemos comprovar os efeitos do AS mediados na produção de metabólitos secundários que foram aumentados conforme a concentração de AS. Foi utilizado para os ensaios de elicitação AS nas concentrações de 0,5 , 1,0 e 5 mmol/L. Para o monitoramento da cultura e averiguação da efetividade dos ensaios de elicitação foi utilizado a monitoria através da dosagem de proteínas totais, compostos fenólicos totais e açúcares redutores totais tanto liberados para o meio extracelular quanto produzidos no meio intracelular. Foi determinado as variações dos componentes da parede celular durante a fase de crescimento e após os ensaios de elicitação onde foi comprovado que quanto maior a concentração de AS, maiores são os fragmentos de açúcares fragmentados da parede celular. Foi evidenciado também a presença de triterpenos na cultura celular (em comparação com os padrões isolados da planta), tanto na fase de crescimento e também após a indução com os ensaios de elicitação com AS.

Summary: *Momordica charantia* is a plant from the Cucurbitaceae family. In Brazil, it is known by the popular name of Melão de São Caetano. It is found across the whole world, and in Brazil it can be found in coastal and interior regions of the country. The aim to study *Momordica charantia* is due to its known therapeutic properties that are already used for thousands of years through popular culture. The studies have confirmed and understood various drug-like properties of this plant and the mechanisms responsible for such functions in this species, such as antidiabetic, antiviral and anticancer properties. The researches with *Momordica charantia* were all performed using extracts obtained from seeds, leaves, roots and fruit. In this work, the isolation and characterization of metabolites as standards from leaves and stems of *Momordica charantia* was performed. The research of secondary metabolites

produced in cell culture suspension of *Momordica charantia* without elicitor or after elicitation with salicylic acid (SA) was conducted. Salicylic acid is a plant hormone involved in various mechanisms of responses. When the plant suffers an infection or injury, it is followed by an increase in AS concentration. This increase leads to activation of certain metabolic pathways that culminate in the production of secondary metabolites and degradation, fragmentation or cell wall thickening. AS was utilized for the elicitation experiments at 0.5, 1.0 and 5 mmol/L. For the monitoring of plant cell culture, it was determined the total protein, phenolic compounds and reducing sugars content, into the extra and intra cellular medium. Where it was verified that AS modulates the production of these molecules in culture. After this, we determined the variation in the oligosaccharides in the extracellular medium obtained in the presence or absence of AS. It was observed the degree of polymerization of oligosaccharides higher when increase AS concentration in the medium. In conclusion, this study can demonstrate the effects of SA on the production of secondary metabolites in plant cell culture, which were increased as the concentration of AS increased. The presence of triterpenes in cell culture was confirmed to compare the molecules obtained from culture with that isolated from plant standards.

Comissão: Sergio Akira Uyemura
Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli
Gilberto Ubida Leite Braga

- Aluno:** Maryna Aguilar Tannous
- Orientador:** Andréia Machado Leopoldino
- Defesa:** 03/10/2014
- Título:** O papel da proteína SET no perfil de metilação do miR-9 e no reparo de DNA em células humanas de carcinoma espinocelular oral
- Title:** The role of SET protein in miR-9 methylation profile and DNA repair in human oral squamous cell carcinoma
- Resumo:** O início e a progressão do carcinoma espinocelular oral (CEO) são caracterizados pela aquisição de alterações genéticas e epigenéticas. A proteína SET é descrita como uma oncoproteína e, recentemente, o seu acúmulo foi mostrado em CEO. Diversas funções têm sido atribuídas à SET, tais como controle do ciclo celular, sobrevivência celular, migração celular, acetilação de histonas, e resposta ao estresse oxidativo. Este contexto sugere a SET como alvo terapêutico, mas primeiramente, é essencial entender a sua ação na tumorigênese e progressão em CEO. A hipótese central no presente estudo refere-se ao papel da SET na instabilidade genômica e reparo de DNA, bem como na regulação epigenética da expressão de miRNA, com impacto no desenvolvimento e progressão de CEO. O silenciamento estável de RNA foi realizado usando plasmídeo contendo *short hairpin RNA* contra SET (shSET) em linhagens de CEO *in vitro* (HN12 e Cal27) e *in vivo* (tumores xenoinxerto de HN12). Efeitos da redução da SET em CEO, *in vitro* e *in vivo*, foram avaliados no perfil de metilação (MSP, *methylation specific PCR*), expressão de miR-9 (qRT-PCR) e reparo de DNA (reparo *mismatch* e de quebra de fita dupla - DSB). A instabilidade genômica foi abordada por meio de cinco microssatélites (PCR convencional) para avaliar a instabilidade de microssatélites (MSI), e ensaio cometa para avaliar danos ao DNA (SSB, DSB, cross-link, etc.). O *status* de proteínas envolvidas em reparo de DSB (ATM, BRCA1 e MLH1) foi avaliado por imunofluorescência e *Western blotting* (WB). A resposta aos danos no DNA (DDR) induzidos por radioterapia (raios-X) foram analisados nas células HN12 por meio de ensaios clonogênico e de ciclo celular; proteínas associadas à apoptose, autofagia, ciclo celular e reparo foram avaliadas por WB. A redução da SET nas células HN12 modificou a transcrição dos *loci* codificantes do miR-9 por meio da reversão parcial de hipermetilação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para o *locus miR-9-1*, e *in vitro* para o *miR-9-3*, com aumento nos níveis de miR-9 e miR-9*. A análise de 5 microssatélites mostrou alteração no perfil alélico de dois marcadores, *D5S346* e *D2S123*, nas células HN12 shSET e nos tumores xenoinxerto da HN12 shSET (*in vivo*) em relação aos respectivos controles, o que sugere a presença de MSI e é um indício do papel da SET no reparo de DNA tipo *mismatch*. A linhagem HN12 shSET apresentou diminuição de danos no DNA e aumento das proteínas de reparo de DSB, MLH1, ATM, p-ATM e BRCA1 em relação a células HN12 shCTRL. Na DDR induzida por raios-X as células HN12 shSET apresentaram nas primeiras 48 horas uma menor perda de viabilidade (menor % em sub G0/G1), com parada em G2/M, maior nível de ATM ativa, aumento dos níveis de p21 e LC3B-II, além de menor clivagem de PARP e caspase-8 em relação as células HN12 shCTRL; isto sugere uma melhor resposta a danos de DSB e ativação de vias de sobrevivência nas células HN12 shSET. Entretanto, após 12 dias de radioterapia as células HN12 shSET mostraram uma tendência a menor sobrevivência. Portanto, os nossos resultados indicam o envolvimento da SET na regulação transcricional do miR-9, nas vias de reparo do tipo *mismatch* e de DSB em CEO, com potenciais implicações tanto na tumorigênese quanto na progressão da doença.
- Summary:** Oral squamous cell carcinoma (OSCC) onset and progression are characterized by acquisition of genetic and epigenetic alterations. SET protein is known as an oncoprotein and, recently, its accumulation was demonstrated in OSCC. Several functions have been attributed to SET, such as cell cycle control, cell survival, cell migration, histone acetylation, and response to oxidative stress. This context outstands SET as a therapeutic target, but first, it is essential to understand its role in tumorigenesis and progression in OSCC. The central hypothesis of this study refers to SET role in genomic instability and DNA repair, as well as miRNA epigenetic regulation, with impact in OSCC development and progression.

Stable SET knockdown (shSET) was achieved using short hairpin RNA against SET mRNA *in vitro* (HN12 and Cal27, OSCC cell lines) and *in vivo* (HN12 xenografts tumors). Effects of SET knockdown were assessed in OSCC, *in vitro* e *in vivo*, regarding DNA methylation (MSP, methylation specific PCR) and expression of miR-9 (qRT-PCR), and DNA repair (mismatch and double-strand breaks/DSB repair). Genomic instability was addressed by means of five microsatellites (conventional PCR) to assess microsatellite instability (MSI), and comet assay to assess DNA damage (SSB, DSB, cross-link, etc.). The status of proteins involved in DSB repair (ATM, BRCA1 and MLH1) was assessed by immunofluorescence and Western blotting (WB). The DNA damage response (DDR) induced by ionizing radiation (X-rays) was assessed in HN12 cells through clonogenic and cell cycle assays; proteins associated with apoptosis, autophagy, cell cycle and repair were assessed by WB. SET knockdown in HN12 cells modified miR-9 transcription through hypermethylation partial reversal for miR-9-1 locus, both *in vitro* and *in vivo*, and for miR-9-3 *in vitro*, with increase of miR-9 and miR-9* levels. Analysis of 5 microsatellites showed changes in the allelic profile of two markers, *D5S346* and *D2S123*, in HN12 shSET cells (*in vitro*) and HN12 shSET xenografts tumors (*in vivo*) compared to their controls, suggesting MSI and it's a clue of SET role in mismatch repair. HN12 shSET cells showed decreased DNA damage and increased DSB repair protein levels (MLH1, ATM, p-ATM and BRCA1) compared to HN12 shCTRL. In the first 48 hours, HN12 shSET X-rays-induced DDR showed lower loss of viability (lower % in subG0/G1), increased G2/M checkpoint, higher levels of active ATM, p21, LC3B-II, and less PARP and caspase-8 cleavage than HN12 shCTRL. These results suggest a higher efficiency of DSB damage response and activation of survival pathways in the presence of SET knockdown. However, 12 days after radiotherapy, HN12 shSET cells presented a tendency for higher intrinsic radiosensitivity in relation to control. Therefore, our findings indicate a SET involvement in miR-9 transcriptional regulation, and in mismatch and DSB repair, with potential implications in oral tumorigenesis and progression.

Comissão: Andréia Machado Leopoldino
Maria Sol Brassesco Annichini
Luiz Carlos Conti de Freitas

Aluno: Mayra Dorigan de Macedo

Orientador: Simone Kashima Haddad

Defesa: 24/10/2014

Título: Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de *Mycoplasma* spp. em culturas celulares

Title: Development of a platform for molecular detection of *Mycoplasma* spp. in Cell Cultures

Resumo: O cultivo de células humanas para fins experimentais e terapêuticos se firmou como um dos pilares da biologia celular e tem se tornado uma prática laboratorial cada vez mais disseminada. Associada a esse processo está a contaminação por microrganismos, dentre os quais se destacam as bactérias do gênero *Mycoplasma* spp., os quais são os contaminantes detectados com maior frequência *in vitro*. Um dos pontos críticos no processo de garantia da qualidade, pureza e segurança para uso destas células é a adoção de uma metodologia analítica, para detecção de *Mycoplasma* spp., que seja simples e de rápida execução, com sensibilidade e especificidade adequada e economicamente viável. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma plataforma molecular (PCR em tempo real) para detecção de *Mycoplasma* spp. em culturas celulares. Para tanto, foram testados diversos conjuntos de *primers* (gene 16S rDNA) dentre os quais um foi selecionado para a plataforma molecular. Foram utilizadas amostras de DNA obtidas a partir do sobrenadante de cultura. A PCR em tempo real *in house* foi padronizada utilizando o intercalante fluorescente de DNA dupla fita *BRYT Green®* e produziu um fragmento de 270 pares de bases. A temperatura de *melting* para as amostras positivas foi definida no intervalo de 81 a 84°C. A plataforma molecular foi validada por meio dos parâmetros sensibilidade analítica e diagnóstica, especificidade analítica, potencial de arraste, precisão e robustez. O limite de detecção do teste (LOD) foi de 5 cópias/5 µL. Para a especificidade, foi observada reação cruzada com bactérias de relação filogenética próxima e com DNA de célula humana. A sensibilidade diagnóstica foi de 100%. Não houve contaminação por arraste. O coeficiente de variação encontrado no parâmetro precisão foi de 0,64% e 1,80% para a avaliação intra-ensaio e inter-ensaio, respectivamente. O coeficiente de variação da análise robustez foi de 5,42%. Ao comparar a plataforma molecular com o teste comercial, observou-se que 29,85% (n=40) das amostras apresentaram resultados falso-negativos pelo teste comercial. Determinou-se ainda que a PCR em tempo real *in house* foi mais sensível do que o teste comercial. A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou a presença de estruturas sugestivas de espécies de *Mycoplasma* spp. na superfície das células. A análise filogenética permitiu a classificação das espécies encontradas. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram propor o algoritmo para aplicação de um método de detecção simples e rápido para *Mycoplasma* spp.; e fazer deste uma ferramenta para o controle de qualidade das células cultivadas, garantindo a eficiência destas células para uso em pesquisa e maior segurança para uso em terapia celular.

Summary: The culture of human cells for experimental and therapeutic purposes has been consolidated as one of the foundations of cell biology and has increasingly become a widely used laboratory practice. The contamination by microorganisms is associated with this process, among them we can highlight bacteria of the genus *Mycoplasma* spp., which are contaminants more frequently detected *in vitro*. One of the critical points in the process of assuring quality, purity, and safety for the use of these cells is the adoption of an analytical methodology for the detection of mycoplasma that is simple and fast to conduct, with proper sensitivity and specificity and that is also economically viable. The objective of this work was to develop a molecular platform (real time PCR) for the detection of mycoplasmas in cell cultures. Therefore, we tested several sets of primers (16S rDNA gene), among them one was selected for the molecular platform. DNA samples used were obtained from the culture supernatant. *In house* real time PCR was standardized using *BRYT Green®* double-stranded DNA intercalating fluorescent and produced a fragment of 270 pair bases. The melting temperature for the positive samples was set in the range 81 to 84°C. The molecular platform was validated through the parameters: analytical and diagnostic sensitivity, analytical

specificity, carry-over contamination, precision and robustness. The limit of detection of the test (LOD) was 5 copies/5 μ L. For specificity, it was observed a cross reaction with bacteria of close phylogenetic relationship and with human cell DNA. Diagnostic sensitivity was 100%. There was no carry-over contamination. The coefficient of variation was found in the precision values of 0.64% and 1.80% for intra-assay and inter-assay assessment, respectively. The variance coefficient of the robustness analysis was 5.42%. By comparing the molecular platform with the commercial test, we observed that 29.85% (n=40) of the samples showed false negative results by the commercial test. It has been determined further that the real-time PCR *in house* was more sensitive than the commercial test. The analysis by scanning electron microscopy demonstrated the presence of suggestive structures of *Mycoplasma* spp. species in the surface of cells. Phylogenetic analysis allowed the classification of the species found. The results obtained in this work allowed us to propose the algorithm for application of a simple and fast method for mycoplasma detection and making from this tool for quality control for cultured cells, assuring the efficiency of these cells for use in research and greater safety for use in cell therapy more safety to patients subjected to cell therapy.

Comissão: Simone Kashima Haddad
Rodrigo Alexandre Panepucci
Kamilla Swiech Antonietto

Aluno: Adriana Patricia Laurenti Coelho

Orientadora: Cleni Mara Marzocchi Machado

Defesa: 03/11/2014

Título: Avaliação do estado *redox* no sêmen humano e sua correlação com os parâmetros do espermograma

Title: Evaluation of redox state in human semen and its correlation with semen parameters

Resumo: As espécies reativas de oxigênio (ERO) em baixos níveis são necessárias para as funções normais do espermatozoide, as quais estão envolvidas com a capacidade de fertilização. Entretanto, várias evidências demonstram que a produção excessiva de ERO leva ao estresse oxidativo, que por sua vez está relacionado à infertilidade masculina. Uma correlação positiva entre os níveis excessivos de ERO e concentrações anormais de espermatozoides, motilidade e morfologia tem sido descrita. Além disso, a capacidade antioxidante total do sêmen tem sido significativamente menor em casos de infertilidade comparado com casos férteis. O estresse oxidativo também tem sido relacionado ao envelhecimento e há evidências de que o acúmulo de radicais livres danifica o DNA do espermatozoide e prejudica a fertilização. A Organização Mundial da Saúde tem enfatizado a importância da avaliação do estresse oxidativo seminal e recomendado que cada laboratório estabeleça os valores de referência para os parâmetros do sêmen em sua população. O objetivo deste estudo foi avaliar o estado *redox* no sêmen humano e sua correlação com os parâmetros do espermograma. Para tanto, avaliou-se a medida de ERO (quimioluminescência, QL), a atividade antioxidante (QL e catalase), a peroxidação lipídica (malondialdeído, MDA), a medida dos produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) e apoptose/necrose (anexina/iodeto de propídeo, citometria de fluxo) no sêmen humano de homens saudáveis e férteis (Controles; n=7). As metodologias foram padronizadas para aplicá-las à análise do sêmen de homens que estavam em investigação de infertilidade (Pacientes; n=23), e correlacionar os resultados com os parâmetros do espermograma. Os principais resultados mostraram 1) a medida de ERO no sêmen de Pacientes sem alterações no espermograma (Pacientes_a; n=9) foi maior do que aquela para sêmen dos Pacientes com alterações no espermograma (Pacientes_b; n=14) e dos Controles, sugerindo comprometimento da qualidade do sêmen pelo aumento de ERO, mesmo com espermograma normal; 2) não houve diferenças entre os grupos quanto à peroxidação lipídica (MDA), aos AOPP, catalase e apoptose/necrose; 3) quanto às correlações entre os parâmetros analisados, observou-se: correlação positiva entre a medida de ERO no sêmen *in natura* e no sêmen lavado do grupo Pacientes, validando a utilização do sêmen *in natura* para esta metodologia; correlação positiva entre a medida de ERO *in natura* e a apoptose, número de espermatozoides e número de leucócitos somente para o grupo Pacientes_b; correlação entre a medida de ERO *in natura* e a motilidade progressiva somente para o grupo Controle; correlação entre apoptose e número de espermatozoides nos grupos Pacientes e Pacientes_a; estes resultados mostram correlações particulares em cada grupo e correlações compartilhadas, que caracterizam Controles e Pacientes. O perfil da presença e da ausência destas correlações no grupo Controle pode estabelecer um padrão de referência para as análises do estresse oxidativo no sêmen. Os resultados poderão contribuir para a aplicação da medida das ERO e das suas correlações com parâmetros do espermograma na análise de rotina do sêmen humano, para a investigação da infertilidade e de patologias do sistema reprodutor masculino.

Summary: Reactive oxygen species (ROS) at low levels are required for normal function of sperm, which are involved in fertilization capacity. However, evidences show that the excessive production of ROS leads to oxidative stress, which in turn is related to male infertility. A positive correlation between excessive levels of ROS and abnormal sperm concentration, motility and morphology has been described. Moreover, the total antioxidant capacity of the semen has been significantly lower in cases of infertility compared with fertile cases. Oxidative stress has also been associated with aging and there is evidence that the excess of free radicals damages the DNA of sperm and impairs fertilization. The World Health

Organization has emphasized the importance of the evaluation of seminal oxidative stress and recommended that each laboratory establish reference values for the parameters of semen in their population. The aim of this study was to evaluate the redox state in human semen and its correlation with semen parameters. For this purpose, we evaluated the measurement of ROS (chemiluminescence, CL), the antioxidant activity (CL and catalase), lipid peroxidation (malondialdehyde, MDA), the advanced oxidation protein products (AOPP) and apoptosis / necrosis (annexin / propidium iodide flow cytometry) in semen of healthy, fertile men (Controls, n = 7). The methods were standardized to apply them to the analysis of semen of men who were in infertility investigation (Patients, n = 23), and to correlate the results with the parameters of sperm. The main results showed: 1) the measurement of ROS in the semen of patients with normal semen (Patientsa, n = 9) was higher than that for semen of patients with abnormal semen analysis (Patientsb, n = 14) and Controls, suggesting impairment of the quality semen by increasing ROS, despite normal semen; 2) no differences were found among the groups regarding to lipid peroxidation (MDA), the AOPP, catalase and apoptosis / necrosis; 3) concerning the correlations among the parameters analyzed, we observed: positive correlation between the measurement of ROS in semen *in natura* and washed semen of Patients group, validating the use of semen *in natura* for this method; positive correlation between the measurement of ROS in semen *in natura* and apoptosis, number of spermatozoa and leukocytes only for the Patientsb group; correlation between the measurement of ROS in semen *in natura* and progressive motility only for the Control group; correlation between apoptosis and number of spermatozoa in the groups Patients and Patientsa; these results show particular and shared correlations in each group, which characterize Controls and Patients. The profile of the presence and absence of these correlations in the Control group may establish a reference standard for the analysis of oxidative stress in the semen. These results may contribute to the use of the measurement of ROS and their correlations with semen parameters in routine analysis of human semen, for the investigation of infertility and disorders of the male reproductive system.

Comissão: Cleni Mara Marzocchi Machado
Adriana Balbina Paoliello Paschoalato
Luciane Carla Alberici

Aluno: Laís de Lourdes de Lima Balico

Orientador: Sérgio Akira Uyemura

Defesa: 03/11/2014

Título: Caracterização molecular e bioquímica de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *Aspergillus fumigatus*

Title: Molecular and biochemical characterization of a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide carrier of *Aspergillus fumigatus*

Resumo: O *A. fumigatus* é um fungo saprofítico e tornou-se um dos principais agente patogênico oportunista em pacientes imunossuprimidos. Estudos prévios em nosso laboratório foi demonstrado que em mitocôndrias de *P. brasiliensis* e de *A. fumigatus*, o NAD⁺ era capaz de induzir a formação de potencial de membrana mitocondrial, o qual podia ser dissipado por FCCP, sugerindo a presença de um transportador de NAD⁺/NADH, conforme havia sido descrito em *S. cerevisiae*. Através de ferramentas de bioinformática, foi identificado no *Aspergillus Gene Database*, uma sequência com 32% de identidade com o gene *ndt1p* de *S. cerevisiae*. A sequência de cDNA, contendo 1.194 pb foi obtida usando *PCR-Overlapping* e clonada em vetor pGEM®-T Easy. Em seguida, a sequência foi subclonada em vetor de expressão pET28-a(+) e expressa em *E. coli* BL21(DE3). A proteína recombinante foi purificada a partir dos corpos de inclusão e sua identidade confirmada por espectrometria de massas e por *Western Blotting* usando anticorpo anti-His-tag. A proteína recombinante foi utilizada para produção de anticorpo policlonal anti-Ndt1 em coelho. Para expressão em levedura, o cDNA do gene *ndt1* de *A. fumigatus* foi subclonado em vetor pYES2 e as leveduras *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$ foram transformadas. Foi realizada a curva de crescimento e indução da expressão da proteína recombinante Ndt1, a presença da proteína foi detectada utilizando anticorpo policlonal anti-Ndt1 após 16 horas de expressão. Nesse período foi verificado que as leveduras estavam em fase de crescimento exponencial. A cepa duplo mutante apresenta uma taxa de crescimento menor quando comparada com a cepa expressando a proteína recombinante quando crescidas em meio fermentável. As mitocôndrias isoladas de ambas as cepas foram submetidas à medida do potencial de membrana onde apresentavam acoplamento entre a oxidação de substratos e a fosforilação oxidativa. Além disso, ficou evidenciado que na cepa expressando a proteína recombinante, NAD⁺ induziu a formação de um potencial de membrana maior que na cepa controle. O transporte de NAD⁺ foi realizado e demonstrou que a cepa expressando a proteína Ndt1 tinha um aumento na fluorescência de NADH, mostrando que NAD⁺ foi capaz de entrar na matriz mitocondrial e posteriormente ser reduzido a NADH por enzimas da matriz mitocondrial. A determinação da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada utilizando as sondas fluorescentes CM-H2DCFDA e *MitoSox Red* em esferoplastos da levedura *S. cerevisiae*. Ambos experimentos não houve diferença significativa entre a cepa expressando a proteína Ndt1 e a cepa controle. As proteínas carboniladas foram determinadas utilizando anticorpo anti-DNP, após a reação com dinitrofenilhidrazona e não há diferença significativa entre as cepas. Finalmente, para confirmação da localização celular da proteína Ndt1, os esferoplastos de *S. cerevisiae* foram submetidos à microscopia confocal, onde ficou evidenciado a co-localização da proteína Ndt1 com as mitocôndrias na cepa de *S. cerevisiae* transformada com a construção *pYES/ndt1*, o mesmo perfil não foi observado na cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$.

Summary: The *A. fumigatus* is a saprophytic fungus and is a major opportunistic pathogen in immunosuppressed patients. Previous studies in our lab has showed that mitochondrias of the *P. brasiliensis* and *A. fumigatus*, NAD⁺ is able to induce the formation of mitochondrial membrane potential, which could be dissipated by FCCP, suggesting the presence of a NAD⁺/NADH carrier as described in *S. cerevisiae*. Using bioinformatics tools, it was identified in *Aspergillus Gene database* a sequence containing 32% of identity with the gene *ndt1p* of *S. cerevisiae*. A fragment of cDNA was obtained from the *ndt1p* mRNA sequence, containing 1194 bp by using PCR-overlapping and cloned in *pGEM®-T Easy* vector. Then, the sequence was subcloned in pET28-a(+) vector and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant

protein was purified from inclusion bodies and the identity confirmed by mass spectrometry and by Western Blotting using anti-His-tag antibody. The recombinant protein was used to produce polyclonal antibody anti-Ndt1 in rabbit. For expression in yeast, the *ndt1* cDNA of *A. fumigatus* was subcloned into pYES2 vector and the yeast *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$ were transformed. Growth curve and induction of the recombinant protein expression Ndt1 was performed and the protein was detected using a polyclonal anti-Ndt1 antibody after 16 hours of expression. During this period it was found that the yeast were in exponential growth phase. The double mutant strain shows a slower growth rate compared to the strain expressing the recombinant protein growth rate when grown in fermentable medium. The isolated mitochondria from both strains were subjected to measurement of the membrane potential which showed coupling between substrate oxidation and oxidative phosphorylation. Furthermore, these measurements evidenced that the strain expressing the recombinant protein NAD⁺ induced the formation of a membrane potential larger than the control strain. The transport NAD⁺ was evaluated and showed that the strain expressing the protein Ndt1 has an increase in NADH fluorescence, indicating that NAD⁺ was able to enter into the mitochondrial matrix and then reduced to NADH by enzymes from the matrix. The determination of the production of reactive oxygen species was performed using the fluorescent probe CM-H₂DCFDA and *MitoSox Red* in spheroplasts of the yeast *S. cerevisiae*. Both experiments showed no significant difference between the strain expressing Ndt1 protein and strain control. The carbonylated proteins levels were checked using anti-DNP, after the reaction with dinitrophenylhydrazone and there is no significant difference between the strains. Finally, to confirm the cellular localization of the protein Ndt1, spheroplasts of *S. cerevisiae* were subjected to confocal microscopy, which evidenced the co-location of Ndt1 protein with mitochondria in *S. cerevisiae* strain transformed with the construction *pYES/ndt1*. This same profile was not observed in strain $\Delta ndt1\Delta ndt2$.

Comissão: Sergio Akira Uyemura
Nilce Maria Martinez Rossi
Marcia Eliana da Silva Ferreira

Aluno: Lucas Favaretto Tazinafo

Orientador: Maria José Alves da Rocha

Defesa: 14/11/2014

Título: Secreção de vasopressina e ocitocina após estímulo osmótico e hipovolêmico em animais sobreviventes à sepse

Title: Vasopressin and oxytocin secretion after osmotic and hypovolemic stimuli in sepsis surviving animals

Resumo: Vários estudos clínicos e experimentais relatam o aumento das concentrações plasmáticas de vasopressina (AVP) na fase inicial da sepse, como tentativa de restabelecer a pressão sanguínea que nesta fase começa a diminuir. Porém em uma fase mais tardia da doença, as concentrações do hormônio estão reduzidas mesmo sob um quadro de hipotensão progressiva, um dos principais estímulos para aumento da secreção deste hormônio. Este padrão de secreção hormonal alterada também parece ocorrer com o outro hormônio neurohipofisário, ocitocina (OT). O objetivo deste trabalho foi analisar a secreção dos hormônios AVP e OT, após estímulos osmótico e hipovolêmico em animais sobreviventes à sepse. A sepse foi induzida pelo método de ligação cecal e punção (CLP) (1 perfuração com agulha 14G) e os animais observados por 10 dias. Os sobreviventes foram submetidos à estímulo osmótico por desidratação (retirada de água para beber da gaiola) por dois dias, ou hipovolêmico por injeção intraperitoneal (i.p) de Polietileno glicol (PEG) (PEG-4000, 200mg/ml de PBS) por 90 minutos. Os animais controles foram hidratados ou receberam injeção intraperitoneal de PBS 0,01M. Após os estímulos, os animais foram decapitados para coleta de sangue e neurohipófise, para as análises de hematócrito, sódio sérico, osmolalidade plasmática, e dosagem hormonal de AVP e OT plasmática e neurohipofisária. **Resultados:** Os animais sobreviventes à sepse mantiveram a capacidade de responder aos estímulos com relação à secreção de AVP. Porém estes animais apresentaram uma secreção diminuída de OT após desidratação embora nenhuma alteração de secreção aparente ao estímulo volêmico. **Conclusão:** Animais sobreviventes à sepse apresentam alterações no padrão de resposta hormonal do eixo hipotálamo-neurohipofisário ao estímulo osmótico sem aparente alteração quando o estímulo é volêmico, sugerindo que seus osmorreceptores encontram-se alterados.

Summary: Many clinical and experimental studies reported the increase of plasma vasopressin (AVP) concentration in the early phase of sepsis, as an attempt to restore blood pressure that begins to decrease at this stage. However, in a later stage of the disease, the hormone concentrations are reduced even under a state of progressive hypotension, one of the major stimulus for the increase of secretion of this hormone. This pattern of impaired hormonal secretion during sepsis also seems to happen to the other pituitary hormone, oxytocin (OT). The aim of this study was to evaluate the secretion of the hormones AVP and OT after osmotic and hypovolemic stimuli in sepsis surviving animals. Sepsis was induced by cecal ligation and perforation (CLP) (1 perforation with 14G needle) and the animals observed for 10 days. The survivors were submitted to osmotic stimulus by dehydration (privation of drinking water from the Cage) for two days, or hypovolemic by intraperitoneal (i.p) injection of polyethylene glycol (PEG) (PEG-4000, 200mg/ml of PBS) for 90 minutes. The control animals were hydrated or that received intraperitoneal injection of PBS 0,01M. After the stimuli, the animals were decapitated for the collection of blood and neurohypophysis, for the analysis of hematocrit, serum sodium, plasma osmolality and hormonal analysis of AVP and OT in the plasma and neurohypophysis. **Results:** Sepsis surviving animals maintained the capacity of answering the stimulus with AVP secretion. But these animals presented a lowered secretion of OT after dehydration, while they presented no alterations in secretion after volemic stimulus. **Conclusion:** Sepsis surviving animals presented alterations in the pattern of hormonal answer for the osmotic stimulus, with lowered secretion of OT, apparently there are no alterations in the pattern of a hormonal secretion after hypovolemia.

Comissão: Maria Jose Alves da Rocha

Angelita Maria Stabile
Rafael Simone Saia