

# RESUMO DAS DISSERTAÇÕES E TESES DEFENDIDAS EM 2010 NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA HUMANA E EXPERIMENTAL DA FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA<sup>1, 2</sup>

## AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROTETORA DO ANTÍGENO KMP-11 CONTRA *LEISHMANIOSE CUTÂNEA* CAUSADA POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*

## PROTECTIVE CAPACITY OF THE KMP-11 ANTIGEN AGAINST CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY *L. BRAZILIENSIS*

Diego Moura Santos

Dissertação de Mestrado PPgPHE da FMB-UFBA. E-mail: [dmoura@bahia.fiocruz.br](mailto:dmoura@bahia.fiocruz.br)

A KMP-11 é uma proteína da superfície externa da membrana citoplasmática presente nos membros da família Tripanosomatidae, a qual, quando utilizada em protocolos de imunização, é capaz de proteger hamsters e camundongos da infecção por *Leishmania donovani* e proteger camundongos da infecção por *L. major*. Neste trabalho avaliamos a capacidade protetora da imunização com KMP-11 contra a infecção causada por *L. braziliensis*. Para isso, camundongos BALB/c foram imunizados com DNA plasmideal que codifica a KMP-11 (KMP-11 DNA) e/ou com KMP11 recombinante (KMP-11r) encapsulados ou não em nanopartículas (NPs), as quais podem ser utilizadas como parte de um eficiente sistema de administração de antígenos apropriados para ativar as células T. As duas formulações, DNA e proteína recombinante, na presença ou não de NPs foram testadas empregando-se duas estratégias de imunização: homóloga e heteróloga. Os animais foram desafiados com *L. braziliensis* na presença de saliva de *Lutzomyia intermedia*, mimetizando a infecção natural. Em diferentes momentos após o desafio, o grau de proteção de cada estratégia de imunização foi estimado por ensaio de diluição limitante e pela progressão da lesão. A resposta imune celular foi avaliada antes e após o desafio. Nós demonstramos que animais imunizados com KMP-11 DNA (imunização homóloga) ou com KMP-11 encapsulado em NPs (DNA NP/KMP-11r NP) (imunização heteróloga) apresentaram uma diminuição na carga parasitária, sem diferença no tamanho da lesão, quando comparado com camundongos controles. Por outro lado, camundongos imunizados com KMP-11 DNA/KMP-11r (imunização heteróloga) e com KMP-11 DNA NP (imunização homóloga) não apresentaram diminuição na carga parasitária frente ao desafio. Observamos que estas duas estratégias de imunização levaram a produção de TNF- $\alpha$ . Com isso, podemos concluir que a proteína KMP11, nas formulações citadas acima, não foi capaz de evitar o desenvolvimento da leishmaniose cutânea, embora tenha sido capaz de reduzir a multiplicação de *L. braziliensis*.

**Palavras-chaves:** KMP-11; *L. braziliensis*; Nanopartículas; Imunização; Leishmaniose cutânea.

*KMP-11 is a surface protein, widely found in the members of family Tripanosomatidae that is able to protect hamsters and mice from infection with Leishmania donovani, and mice from infection by L. major. In the present study, we analyzed the protective capacity of KMP-11 against infection with L. braziliensis. With this purpose, BALB/c mice were immunized with plasmid DNA (KMP-11 DNA) and/or with the recombinant KMP-11 (KMP-11r), encapsulated or not in nanoparticles (NP) which can be used as an efficient antigen delivery system, able to activate T cells. Both antigen combinations, plasmid DNA and recombinant protein, encapsulated or not in NPs, were tested, employing two immunization strategies: homologous or heterologous. Mice were then challenged with live L. braziliensis in the presence of sand fly saliva, mimicking the natural infection. At different times after the challenge, protection level of each immunization strategy was estimated by limiting dilution assay and evaluation of lesion progression. The cellular immune response was evaluated before and after challenge. We demonstrated that immunization with KMP-11 DNA (homologous immunization) and with KMP-11 encapsulated in NPs (DNA NP/KMP11r NP -heterologous immunization) did not prevent lesion progression, although it decreased parasite load. We observed that both of these immunization strategies induced a significant increase in TNF- $\alpha$  production. We can conclude that immunization with KMP-11, when administered via the above mentioned strategies was unable to prevent disease development in mice infected with L. braziliensis. However, immunization led to a reduction of parasite load at the site of infection.*

**Key words:** KMP-11; *L. braziliensis*; Nanoparticles; Immunization; Cutaneous leishmaniasis.

<sup>1</sup> Em convênio com o Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)/Universidade Federal da Bahia.

<sup>2</sup> Nota do Editor: cabe às coordenações dos programas (PPgPHE, PPgMS, PPgSAT e PPgCS), o encaminhamento dos Resumos.

## **AVALIAÇÃO DE IN1 COMO UM AGENTE COM UM NOVO POTENCIAL QUIMIOTERÁPICO PARA CONTROLE DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA***

### **EVALUATION OF THE IN1 AS A NEW POTENTIAL CHEMOTHERAPEUTIC AGENT TO THE CONTROL OF LEISHMANIA INFECTION**

Antônio Luis de Oliveira Almeida Petersen

Dissertação de Mestrado PPgPHE da FMB-UFBA. *C-elo: petersen.swe@gmail.com*

Resumo e Abstract, excluídos a pedido do autor.

## **CAPACIDADE PROTETORA DAS HISTONAS NUCLEOSSOMAS CONTRA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR CAUSADA POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

Márcia Weber Carneiro

Dissertação de Mestrado PPgPHE da FMB-UFBA. *C-elo: mwcweber@gmail.com*

Neste trabalho avaliamos a capacidade protetora das histonas nucleossomais da *Leishmania infantum* contra a infecção causada por *Leishmania braziliensis*. Para isso, camundongos BALB/c foram imunizados com plasmídeos de DNA e/ou com proteínas recombinantes referentes às histonas nucleossomais, utilizando duas estratégias de imunização: homóloga e heteróloga. Posteriormente, os animais foram desafiados com *L. braziliensis* na presença de saliva de *Lutzomyia intermedia*, mimetizando a infecção natural. Em diferentes momentos após o desafio, o grau de proteção de cada estratégia foi estimado por ensaio de diluição limitante e pela progressão da lesão. O recrutamento celular foi avaliado por análise histopatológica. A resposta imune celular foi analisada por citometria de fluxo e por PCR em Tempo Real. Nós demonstramos que animais imunizados com plasmídeos de DNA apenas ou com plasmídeos de DNA/proteína recombinante apresentaram um menor desenvolvimento da lesão e menor carga parasitária no sítio de inoculação, bem como nos linfonodos de drenagem. Além disso, estes animais apresentaram um predomínio da resposta Th1, relacionada com a defesa contra patógenos intracelulares. Por outro lado, camundongos imunizados apenas com proteínas recombinantes desenvolveram lesões, apesar de apresentarem redução na replicação parasitária. Nesse grupo, houve um predomínio de resposta imune do tipo Th2. Com isso, podemos concluir que a imunização com histonas é capaz de induzir uma resposta imune protetora contra a *L. braziliensis*. Estes resultados confirmam o potencial destes antígenos como candidatos a vacina para leishmaniose cutânea. **Palavras-chaves:** *Leishmania braziliensis*; Imunização homóloga; Heteróloga; Leishmaniose cutânea; Histonas nucleossomais.

*In the present study, we analyzed the protective capacity of the nucleosomal histones of Leishmania infantum against the infection with L. braziliensis. To do so, BALB/c mice were immunized with DNA plasmids and/or with the recombinant Leishmania nucleosomal histones, using different immunization strategies: homologous and heterologous. Mice were then challenged with L. braziliensis in the presence of sand fly saliva, mimicking the natural infection. At different times after challenge, the protective capacity of each immunization strategy was estimated by limiting dilution assay and by measurement of lesion progression. Cellular recruitment was assessed by histologic analyses. The immune response was characterized by Flow Cytometry and Real Time PCR. We demonstrated that mice immunized with DNA only or with DNA/recombinant protein displayed lower lesion progression and parasite burden at the infection site and in draining lymph nodes. Accordingly, these mice presented a predominant Th1 response, associated with defense against Leishmania. On the other hand, mice immunized with recombinant proteins did not prevent lesion progression, even though parasite burden was reduced. These animals presented a predominant Th2. Therefore, we can conclude that immunization with Leishmania histones induced a protector response against L. braziliensis infection. These results confirm nucleosomal histones as potential vaccine candidates for cutaneous leishmaniasis.*

**Key words:** *Leishmania braziliensis*; Heterologous; Homologous; cutaneous leishmaniasis; Nucleosomal histones.

## PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES KAPPA-OPIOIDES CENTRAIS NA INGESTÃO DE SAL ROLE OF CENTRAL KAPPA-OPIOID RECEPTORS IN THE CONTROL OF SALT INTAKE IN RATS

Ana Isabel Reis Nascimento

Dissertação de Mestrado PPgPHE da FMB-UFBA. C-elo: airnascimento@yahoo.com.br

Alguns estudos sugerem que as vias opiatérgicas centrais parecem desempenhar um papel regulatório no controle da ingestão de água e de sal em mamíferos. As ações dos opioides centrais sobre a regulação do controle hidroeletrólítico são mediadas por vários dos subtipos de receptores opiáceos. O papel dos receptores kapa-opioides centrais neste processo não está adequadamente elucidado sendo necessário mais estudos que o esclareçam. **Objetivo:** Este estudo investigou o envolvimento dos receptores kappa-opioides centrais no apetite por sódio em ratos depletados de sódio. **Material e Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar (220-250 g), submetidos a cirurgia estereotáxica para implante de cânula guia no VL esquerdo. Seis dias após a cirurgia os animais foram submetidos a depleção por furosemida combinada com dieta hipossódica. No sétimo dia receberam injeção i.c.v. do antagonista kapa-opioide nor-BNI, nas doses de 5 (n=6), 10 (n=14) e 20 nmol / rato. Quinze minutos após a injeção central de nor-BNI os bebedouros de água e de salina hipertônica foram introduzidos nas caixas. No segundo modelo de estudo os animais sofreram administração central de nor-BNI, 5 (n=10), 10 (n=12) e 20 nmol / rato, 30 minutos antes de receberem injeções i.c.v. de AII na dose de 10 ng / rato. Os bebedouros de água e de solução salina foram introduzidos nas caixas logo após a segunda injeção i.c.v. A ingestão de solução salina hipertônica 1,5% e de água foi monitorada nos tempos 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos, após a colocação dos bebedouros. A análise estatística utilizada foi ANOVA para medidas repetidas seguida do pós-teste de Bonferroni para múltiplas comparações através do programa GraphPad Prism 5. **Resultados:** Os grupos de ratos que receberam injeções i.c.v. de nor-BNI após depleção de sódio e ativação angiotensinérgica central, apresentaram redução estatisticamente significativa na ingestão de salina quando comparados ao grupo de animais controles. Essa diferença (p<0,05) se iniciou aos 15 minutos, após o início da sessão experimental e permaneceu até o final da sessão experimental. A ingestão de água permaneceu inalterada nos dois modelos de indução do apetite por sódio. **Conclusões:** Os dados presentes sugerem que os receptores kapa-opioides centrais parecem desempenhar papel fundamental na expressão do comportamento de aquisição de sal em ratos que sofreram depleção de sódio e ativação central do apetite por sódio induzido pela via angiotensinérgica.

**Palavras-chaves:** Opioides; Receptor kapa-opioide; Apetite por sal; Nor-BNI.

*Central opioid pathways seem to have an important role on the control of water and salt intake in mammals, and brain opioid peptides may influence hydroelectrolyte balance through a myriad of actions mediated by distinct opioid receptors. The specific role of central kappa-opioid receptors (KOR) in this process is far from being fully understood. In the present work, we investigated the role of those receptors in the control of water and salt intake, in sodium-depleted rats. Wistar male rats (220-250 g) were used in the experiment after stereotaxic cannulation of the left lateral ventricle. To study the effect of the blockade of central KOR on water and salt intake in sodium depleted, rats the animals were sodium depleted by the concomitant use of sc injections of furosemide and were kept in hyposodic diet, six days after surgery. In the seventh day, they received intracerebroventricular injections of a selective kappa-opioid receptor antagonist (nor-BNI) at the doses of 5 (n=6), 10 (n=14) and 20 (n=7) nmol. Bottles containing water or hypertonic saline solution were introduced into the cages 15 min after the central administration of nor-BNI. To study the effect of the blockade of central KOR on water and salt intake in animals after central angiotensinergic stimulation, the animals received intracerebroventricular injections of nor-BNI at the doses of 5 (n=10), 10 (n=12) and 20 (n=8) nmol 30 min before receiving central injections of angiotensin II (AII) at the dose of 10 ng. In this case, bottles containing water or hypertonic saline solution were introduced into the cages immediately after the central administration of AII. Water and salt intake were recorded for the next 2 hours after the introduction of the bottles into the cages. Data were analyzed by ANOVA Two-Way followed by Bonferroni as post-hoc test. The blockade of central KOR by the administration of nor-BNI yielded a significant, dose-dependent inhibition in salt intake in sodium depleted rats and in animals receiving pharmacological stimulation of central angiotensinergic pathways. The same treatment failed to alter water intake in all groups studied. The data suggest that central KOR are essential for the full expression of salt intake in sodium depleted rats and in rats whose salt intake is increased by central angiotensinergic stimulation.*

**Key-words:** Opioids; Kapa opioid receptor; Salt appetite; Nor-BNI.

# ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA MUCOSA INTESTINAL DE CÃES NATURALMENTE E EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *LEISHMANIA CHAGASI*

## HISTOPATHOLOGICAL ASPECTS OF THE INTESTINAL MUCOSA OF DOGS NATURALLY OR EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *LEISHMANIA CHAGASI*

Rayssa Maria de Araújo Carvalho

Dissertação de Mestrado PPgPHE da FMB-UFBA. C-elo: rayssacarv@gmail.com

O cão é considerado o principal reservatório doméstico da *Leishmania (L.) chagasi*. A compreensão adequada da LV canina poderá ajudar no estabelecimento racional de medidas de controle. Para tal a existência de modelo experimental que reproduza fielmente a enfermidade naturalmente transmitida será de grande valia. Em cães naturalmente infectados, frequentemente observa-se infiltração da mucosa intestinal por amastigotas, o parasitismo neste local pode representar um “santuário” para a manutenção do parasita, devido aos fatores imunológicos característicos da mucosa intestinal. No presente trabalho, investigamos os aspectos histopatológicos da mucosa intestinal na leishmaniose visceral canina, comparando cães naturalmente infectados (CNI) com animais experimentalmente infectados (CEI) como uma etapa necessária para a validação do modelo canino da LV. Foram analisados cortes histológicos do íleo e do cólon, corados com hematoxilina e eosina, de 16 cães com LV, sendo 8 cães naturalmente infectados e 8 cães experimentalmente infectados. O grupo CEI foi infectado com 107 promastigotas de *L.chagasi* na face interna da orelha direita e acompanhados por 735 dias, os CNI foram cedidos pelo centro de zoonoses de Teresina e apresentaram no momento da seleção sorologia positiva e sinais clínicos característicos de LV. A técnica de PCR foi utilizada para detectar a presença do parasita no íleo, cólon e linfonodo mesentérico. O intestino de todos os cães estudados apresentou positividade, por esta técnica, em pelo menos um segmento. Nos CEI, todos foram positivos no íleo e linfonodo mesentérico, já no cólon a detecção foi em 62,5% dos animais. Nos CNI, o íleo e o cólon apresentaram a mesma taxa de detecção (75%), e linfonodo mesentérico positivou em 87,5% dos animais. O perfil inflamatório do intestino foi similar nos dois grupos, exceto pelo maior número de macrófagos ( $p=0,0461$ ) e congestão ( $p=0,0313$ ) observado no íleo dos cães experimentalmente infectados. Desse forma, concluímos que o modelo experimental reproduz a infecção natural, no que diz respeito ao processo inflamatório intestinal.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose visceral; *L.chagasi*; Intestino; Cães.

*Understanding the canine visceral leishmaniasis (VL) may help establish rational control measures, as the dog is the main domestic reservoir of Leishmania infantum chagasi. A major factor in canine VL is the persistence of parasites even after treatment. The existence of an experimental model that reproduces the naturally disease have a great value. In naturally infected dogs, it has been reported an infiltration of the intestinal mucosa by Leishmania amastigotes. The intestine may represent a 'sanctuary' for maintaining the parasite, due to immune factors characteristic of the intestinal mucosa. The existence of an experimental model able to reproduce the naturally-transmitted canine VL would be of great value in exploring the characteristics of the intestinal infection by L. infantum chagasi. In this study, we investigated the histopathological aspects of the intestinal mucosa in canine VL, comparing naturally infected dogs (NID; n=8) with experimentally infected animals (EID; n=8) as a necessary step to validate the canine model of VL. . The EID group was infected with 107 promastigotes of L. infantum chagasi combined with Lutzomyia longipalpis saliva and followed for 735 days. NID were provided by the Center of Animal Disease of Teresina and presented at the time of screening positive serology and characteristic clinical signs of VL. The PCR was used to detect the presence of the parasite in the ileum, colon and mesenteric lymph nodes. The intestine of all dogs studied was positive by this technique in at least one segment. In the EID, all were positive in the ileum and mesenteric lymph nodes, while in the colon was detected in 62.5% of animals. In NID, ileum and colon showed the same detection rate (75%), and mesenteric lymph nodes were positive in 87.5% of animals. Histological study of ileum and colon, stained with hematoxylin and eosin showed that the profile of inflammation was similar in both groups, except for a greater number of macrophages ( $p = 0.0461$ ) and congestion ( $p = 0.0313$ ) observed in the ileum of experimentally infected dogs. We conclude that the experimental model reproduces the natural infection in the inflammatory intestine disease.*

**Key words:** Visceral Leishmaniasis; *L. chagasi* ; 3. Intestine; 4.dog.

# **PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES MU, DELTA E KAPPA-OPIOIDES NA RESPOSTA HIPOTENSORA À ADMINISTRAÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE AGONISTA DOS RECEPTORES 5HT<sub>3</sub>**

## **HYPOTENSIVE RESPONSE INDUCED BY CENTRAL 5-HT<sub>3</sub> RECEPTOR STIMULATION DEPENDS ON THE FUNCTIONAL INTEGRITY OF CENTRAL $\mu$ , K AND D OPIOID RECEPTORS AND RELIES ON A SYMPATHOINHIBITORY MECHANISM**

Elenilda Farias de Oliveira

Dissertação de Mestrado PPgPHE da FMB-UFBA. C-elo: [didafarias@yahoo.com.br](mailto:didafarias@yahoo.com.br)

Estudos mostram a participação das vias serotoninérgicas e opiatérgicas centrais no controle da pressão sanguínea. A existência de interação entre vias serotoninérgicas e opiatérgicas centrais tem sido demonstrada por diferentes autores. O presente trabalho foi desenvolvido para investigar a participação dos receptores do tipo  $\mu$ , k e d opiatérgicos centrais na resposta hipotensora induzida por ativação serotoninérgica e o papel do sistema nervoso simpático. Foram utilizados ratos Wistar (280 a 320g) submetidos a cirurgia de estereotaxia com canulação do ventrículo lateral. Um dia antes da sessão experimental, os animais foram submetidos à cateterização da artéria carótida para registro da pressão sanguínea e da veia jugular para infusão de drogas. A pressão sanguínea e frequência cardíaca foram registradas continuamente por 120 min após a injeção das drogas (Sistema de Aquisição de Dados - AqDados) e expressas como delta da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) em relação aos valores pré-injeção. A administração de m-CPBG, agonista serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub> (160 nmol) em animais pré-tratados com salina causou redução significativa da pressão sanguínea. A administração de ondansetrona, antagonista serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub> (80 nmol) promoveu aumento significativo da pressão sanguínea. O pré-tratamento com ondansetrona bloqueou a resposta hipotensora decorrente da ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>. O pré-tratamento com os antagonistas opiatérgicos naloxona, (30 nmol) e nor-binaltorfimina (10 nmol) bloqueou resposta hipotensora decorrente da ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub>, enquanto o pré-tratamento com o antagonista naltrindole (1 nmol) promoveu resposta hipertensora. A administração dos antagonistas isoladamente não promoveu alterações significativas da pressão sanguínea e frequência cardíaca. O bloqueio simpático periférico com prazosin (3mg/mL), antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, impediu bloqueio à hipotensão promovido pelo antagonista nor-binaltorfimina, e reduziu parcialmente o bloqueio promovido pelos antagonistas naloxona e naltrindole. Os dados sugerem que a resposta hipotensora decorrente da ativação farmacológica dos receptores 5-HT<sub>3</sub> centrais é dependente da integridade funcional dos receptores opióides tipo  $\mu$ , k e d localizados no sistema nervoso central e é justificada por um mecanismo de inibição da atividade simpática.

*Central serotonergic and opiate pathways participate in the mechanisms regulating blood pressure. Furthermore, interaction between serotonergic and opiate circuits at the central nervous system has been demonstrated. In the present study, we investigated the role of central  $\mu$ , k and d opioid receptors in the hypotensive response obtained after pharmacological activation of central 5-HT<sub>3</sub> receptors, as well as the role of the sympathetic nervous system in this response. Wistar male rats (280-320 g) had the right lateral ventricle cannulated 5 days before the experimental sessions; polyethylene catheters were inserted into the left carotid artery (for blood pressure monitoring) and into the right jugular vein (for drug administration) 24h before the experiments. Blood pressure and heart rate were monitored for the next 2 hours after the administration of the drugs (Data Acquisition System by AqDados). Data were expressed as delta mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). The MAP value at the end of the stabilization period was considered the reference blood pressure at time zero and delta values are presented throughout the experiments. The central administration of m-CPBG, a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist (160 nmol) induced a significant decrease in MAP in control (saline-pretreated) animals. Conversely, the central administration of ondansetron, a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist (80 nmol), evoked a significant increase in MAP. Pretreatment with ondansetron abolished the hypotensive response obtained after the stimulation of central 5-HT<sub>3</sub> receptors by m-CPBG. Pretreatment with naloxone (30 nmol), a non-selective opioid antagonist, and with nor-binaltorfimine (NOR-BNI), a selective k-opioid receptor antagonist, blocked the hypotensive response observed after central 5-HT<sub>3</sub> receptor stimulation. On the other hand, pretreatment with naltrindole (1 nmol), a selective d-opioid antagonist, blocked the hypotensive response generated by central 5-HT<sub>3</sub> receptor stimulation and promoted, after 15 minutes, a significant hypertensive response. The administration of each one of the opioid antagonists alone was unable to promote any significant change in MAP and HR. The blockade of sympathetic function by the peripheral administration of prazosin ( $\alpha_1$  receptor blocker) abolished the blockade of the hypotensive response observed after 5-HT<sub>3</sub> receptor stimulation induced by the k-opioid receptor antagonist NOR-BNI and blunted the blockade of the hypotensive response previously seen in animals treated with m-CPBG and pretreated with the opioid antagonists naloxone and naltrindole. The data presented here suggest that the hypotensive response obtained after the central stimulation of 5-HT<sub>3</sub> receptors depends on the functional integrity of central  $\mu$ , k and d opioid receptors and relies on a sympathoinhibitory mechanism.*



## ASPECTOS DA ADMISSÃO E EVOLUÇÃO DE CRIANÇAS HOSPITALIZADAS COM SUSPEITA DE PNEUMONIA ADQUIRIDA NA COMUNIDADE EM SALVADOR

### ADMISSION AND EVOLUTION ASPECTS OF CHILDREN HOSPITALIZED WITH SUSPECTED PNEUMONIA IN SALVADOR, BAHIA

Raquel Simbalista de Queiroz

Dissertação de Mestrado PPgPHE da FMB-UFBA. *C-elo: r.simbalista@terra.com.br*

**Introdução:** A pneumonia na infância permanece um assunto relevante, tendo em vista a sua elevada taxa de mortalidade mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. **Objetivo:** Descrever o resultado da hospitalização de crianças internadas com suspeita diagnóstica de pneumonia. **Desenho do estudo:** Coorte retrospectiva. **Material e métodos:** Foi realizado acompanhamento retrospectivo de pacientes internados com suspeita de pneumonia em um centro pediátrico, de outubro de 2002 a outubro de 2005. A partir dos prontuários médicos, dados demográficos, de história clínica, do exame físico, do tratamento, da evolução e do desfecho foram coletados e registrados em formulário específico para o estudo. Todos os casos incluídos tiveram as radiografias de tórax avaliadas por radiologista cego às informações clínicas, com o objetivo de definir a presença ou não de infiltrado pulmonar e avaliar a presença de alterações radiológicas outras. A população do estudo foi alocada em quatro grupos diferentes, para que pudessem ter suas variáveis comparadas entre pacientes com características semelhantes. **Resultados:** No grupo das crianças e" 2 meses de idade, internadas com diagnóstico clínico-radiológico de pneumonia e tratadas com penicilina cristalina, as frequências de febre (46,4% vs. 26,3%,  $P=0,002$ ), taquipnéia (73,6% vs. 59,4%,  $P=0,003$ ), tiragem subcostal (29,4% vs. 12,7%,  $P<0,001$ ) e aleteo nasal (10,2% vs. 1,6%,  $P=0,001$ ) diminuíram de forma significativa entre a admissão e o primeiro dia de tratamento. A penicilina foi substituída após 48 horas por outros antibióticos em 28 (18,2%) dos pacientes, nos quais houve redução significativa da taquipnéia entre o primeiro e o segundo dia de tratamento (86,4% vs. 50,0%,  $P=0,008$ ). Nas crianças com idade < 2 meses, internadas com diagnóstico clínico ou clínico-radiológico de pneumonia e tratadas com antibióticos diversos, o esquema antibiótico mais utilizado foi a monoterapia com penicilina cristalina e derivados ou associação com cefalosporinas (68,9%). A antibioticoterapia inicial foi modificada em 8,9% dos casos, tendo 62,5% e 58,5% recebido alta após cura ou melhora, respectivamente. Entre aqueles que não modificaram a terapêutica inicial, 58,5% foram classificados como cura e 41,5% como melhora. Nas crianças com idade e" 2 meses, com diagnóstico clínico ou clínico-radiológico de pneumonia, tratadas com antibióticos diversos, excluindo-se aquelas pertencentes aos outros grupos, a escolha inicial por penicilina cristalina foi mais frequente. Com relação ao desfecho, 191 (64,1%) dos pacientes receberam alta após cura e 107 (35,2%) após melhora clínica. Finalmente, entre as crianças com idade e" 2 meses internadas com diagnóstico clínico ou clínico-radiológico de pneumonia tratadas com penicilina cristalina, o que incluiu aquelas do primeiro grupo, todas foram consideradas curadas (72,6%) ou com melhora clínica (27,4%) no momento da alta hospitalar. A frequência de cura foi maior entre os pacientes que não modificaram a antibioticoterapia inicial ( $p<0,001$ ). **Conclusões principais:** Pôde-se observar que em todos os grupos, indistintamente, a antibioticoterapia concordante permaneceu como uma conduta fundamental para o tratamento da pneumonia. Além disso, a aderência à antibioticoterapia empírica conforme as diretrizes foi considerável, principalmente quando o diagnóstico clínico foi confirmado pelo radiológico, sendo essa conduta uma das chaves para o tratamento eficaz da pneumonia na faixa etária pediátrica.

**Palavras-chaves:** pneumonia; infecção do trato respiratório; evolução clínica; penicilina; antibióticos.

*Background: Childhood pneumonia remains a relevant issue, due to its mortality rates worldwide, especially in developing countries. Objective: The present study has the main purpose to describe the outcome among children hospitalized with suspected pneumonia. Design: Retrospective cohort. Methods: This is a retrospective review of suspected cases of pneumonia in children hospitalized in a pediatric center of Salvador, North-east Brazil, from October/2002 to October/2005. A standardized form containing data on demographics and clinical history, physical examination, treatment, evolution and outcome during the first five or seven days of hospitalization was filled in for each patient, according to medical charts. The radiological reading was performed by a pediatric radiologist blind to clinical information, to define the presence of pulmonary infiltrate or other findings. The study population was allocated in four distinct groups, to compare each group with homogeneous aspects. Results: Among the group of children aged e" 2 months hospitalized with radiographically diagnosed pneumonia, treated with intravenous aqueous penicillin G, fever (46.4% vs. 26.3%,  $P=0.002$ ), tachypnea (73.6% vs. 59.4%,  $P=0.003$ ), chest indrawing (29.4% vs. 12.7%,  $P<0.001$ ) and nasal flaring (10.2% vs. 1.6%,  $P=0.001$ ) frequencies significantly decreased from admission to first day of treatment. Penicillin was substituted by other antibiotics in 28 (18.2%) patients in whom the sole significant decrease was on tachypnea frequency from first to second day of treatment (86.4% vs. 50.0%,  $P=0.008$ ). Among children aged <2 months hospitalized with suspected pneumonia, treated with several antibiotic schemes, the most frequent first antibiotic scheme were penicillin and derivatives alone or associated with cephalosporines (68.9%). The antibiotic had been changed after 48 hours in 8.9% of cases during hospitalization, and 62.5% were discharged after cure, against 37.5% improvements. From those who did not switched therapy, 58.5% were cured and 41.5% improved. In the group of children aged e" 2 months old hospitalized with suspected pneumonia, excluding those of the other three groups, the choice for penicillin G had higher frequencies than the other schemes registered, among all age groups. According to outcome, 191 (64.1%) those children e" 2 months old hospitalized with suspected pneumonia, treated with intravenous aqueous penicillin G, what includes children from the first group, all were considered improved (27.4%) or cured (72.6%) at the time of hospital discharge, and there was significantly more cure among those who did not switched therapy ( $p<0.001$ ). Main conclusions: From the aforementioned data, it is possible to observe that guideline-concordant empiric antibiotic remains an important procedure to an effective treatment of pneumonia among children of all age groups. Besides, the adherence of empiric antibiotic therapy was good among physicians in our study, especially when there was concordance between the clinical and radiological diagnosis; and this approach is one of the keys to an effective treatment of childhood pneumonia.*

*Key words:* pneumonia; respiratory tract infection; clinical evolution; penicillin; antibiotics.

# IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS DETERMINANTES IMUNOLÓGICOS DE GRAVIDADE NA MALÁRIA HUMANA

## IDENTIFICATION OF POTENTIAL IMMUNOLOGIC DETERMINANTS OF SEVERITY IN HUMAN MALARIA

Bruno Bezerril Andrade

Tese de Doutorado PPgPHE da FMB-UFBA. E-mail: [brunobezerril@gmail.com](mailto:brunobezerril@gmail.com)

A malária é considerada uma das mais importantes doenças infecciosas do mundo. Esta doença é causada por diversas espécies do protozoário *Plasmodium* sp., principalmente o *Plasmodium falciparum* e o *P. vivax*, transmitido por mosquitos do gênero *Anopheles*. Apesar dos esforços governamentais e privados para o desenvolvimento de estratégias para o controle da doença, o panorama atual da malária está piorando, muito em razão do aparecimento de cepas de parasitas resistentes aos medicamentos. Os casos fatais são relatados principalmente na África e são causados pelo *P. falciparum*. Apesar de ser menos letal, a malária causada pelo *P. vivax* é mais amplamente distribuída e pode apresentar também alta morbidade e mortalidade. Na maioria das áreas endêmicas, estudos têm identificado vários fatores relacionados à imunidade clínica ou susceptibilidade aos parasitas. Assim, pelo menos quanto à malária causada pelo *P. falciparum*, idade, polimorfismos genéticos e exposição repetida ao parasita são considerados importantes determinantes da evolução da doença. Infelizmente, pouco tem sido feito na identificação de fatores preditores consistentes que poderiam ser usados para avaliação clínica. Este quadro é ainda pior para malária causada pelo *P. vivax*, provavelmente porque muitos pesquisadores consideram que é uma doença benigna. Além disso, como a maioria do conhecimento atual sobre a patogênese da malária não ajudou a reduzir a ocorrência da infecção e suas complicações, novas abordagens são necessárias para superar este cenário desfavorável. Esta Tese reúne um conjunto de seis manuscritos que visam identificar potenciais determinantes da gravidade da malária em uma área endêmica da Amazônia Ocidental Brasileira. Em primeiro lugar, um método preciso e eficaz para o diagnóstico da malária foi rastreado através da comparação de vários testes, incluindo um software baseado em redes neurais artificiais. O ensaio molecular mostrou-se o mais eficiente para o diagnóstico da malária sintomáticos e assintomáticos. Além disso, a utilização racional de um teste rápido para diagnóstico da malária pode ser promissora em áreas onde há dificuldade na formação continuada dos técnicos diagnósticos. A rede neural artificial indicou que o balanço de citocinas é um forte determinante do quadro clínico. Em outro estudo, uso de sorologia para mensuração de anticorpos IgG contra o sonicado de glândula salivar do vetor *Anopheles darlingi* mostrou-se útil para a avaliação da exposição ao *P. vivax* e também para estimar a imunidade clínica à malária. Em um terceiro estudo com foco na identificação de outros fatores relacionados à imunidade clínica, a exposição natural ao vírus da hepatite B mostrou-se associada à redução da gravidade clínica da malária causada tanto pelo *P. vivax* quanto pelo *P. falciparum*. No que diz respeito exclusivamente à malária vivax, os casos graves apresentaram uma intensa e desregulada resposta inflamatória sistêmica. Nestes pacientes, a enzima antioxidante superóxido dismutase-1 surgiu como um excelente marcador da gravidade e mostrou-se envolvida na patogênese da doença grave, na qual há uma liberação de grandes quantidades de heme livre. Em conjunto, os manuscritos desta tese adicionam importantes informações no entendimento dos mecanismos determinantes da gravidade da malária, extremamente úteis no direcionamento de futuras abordagens focadas no controle da doença.

**Palavras-chaves:** Malária; diagnóstico; biomarcador; inflamação; citocina.

---

*Malaria is considered one of the most important infectious diseases that ever threaten the world. This disease is caused mainly by the infection with Plasmodium falciparum or Plasmodium vivax transmitted by Anopheles mosquitoes. Despite governmental and private efforts for the development of key strategies for the disease control, the actual panorama of the Plasmodium infection is getting worse due to the emergence of drug resistant parasite strains. The lethal cases are reported mostly in Africa and are caused by P. falciparum. Albeit being less lethal, P. vivax infections are more widely distributed and can cause high morbidity and eventually death. In most endemic areas, studies have identified a number of factors related to clinical immunity or susceptibility to the parasites. Thus, at least regarding the falciparum malaria, age, genetic polymorphisms and repeated exposure to Plasmodium are considered most important determinants of the disease outcome. Unfortunately, little has been made in the screening of reliable predicting factors that could be ultimately used for clinical evaluations. This landscape is even worse for vivax malaria, probably because many researches consider it as a benign disease. Moreover, as most of the current knowledge about the malaria pathogenesis did not truly help to relieve the disease burden, new insights are necessary to overcome this unfavorable scenario. This thesis brings together a set of six manuscripts that aim to identify potential determinants of the disease severity linked to the immunopathogenesis in an endemic area from the western Brazilian Amazon. First, a precise and effective method for malaria diagnosis was screened by comparing multiple tests, including a software based of artificial neural networks. The molecular assay showed to be the most efficient for the diagnosis of symptomatic and asymptomatic malaria. In addition, the rational use of a rapid test for the diagnosis of malaria may be promising in areas where there is difficulty in continued training of technical human resources. The artificial neural network indicated that the cytokine balance*

is a strong determinant of the clinical presentation. In another study, the use of serology for measuring IgG antibodies against the sonicate salivary gland of *Anopheles darlingi* vector is a promising marker of exposure to *P. vivax* and can also estimate the clinical immunity. Intriguingly, the natural exposure to the hepatitis B virus appeared as an important factor associated with reduced clinical severity for both *vivax* and *falciparum* malaria. Concerning solely the *vivax* malaria, severe cases have an intense and unregulated inflammatory response. In these patients, the antioxidant enzyme superoxide dismutase-1 has emerged as an excellent marker of severity and was involved in the pathogenesis of the severe disease in which there is a release of large amounts of free heme. Together, the manuscripts of this thesis add important information in understanding the mechanisms that determine the severity of malaria.

**Key words:** Malaria; diagnosis; biomarker; inflammation; cytokine.

## **EFEITO DA SALIVA DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* (LUTZ & NEIVA, 1912) SOBRE NEUTRÓFILOS: APOPTOSE, INFECÇÃO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

### **EFFECT OF *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* (LUTZ & NEIVA, 1912) SALIVA UPON NEUTROPHILS: APOPTOSIS, INFECTION AND INFLAMMATORY RESPONSE**

Deboraci Brito Prates

Tese de Doutorado PPgPHE da FMB-UFBA. *C-elo:* [deboraci@bahia.fiocruz.br](mailto:deboraci@bahia.fiocruz.br)

A saliva de flebotomíneos é uma rica fonte de substâncias farmacologicamente ativas que interferem na resposta imune do hospedeiro. Neste estudo, testamos a hipótese de que componentes da saliva de *Lutzomyia longipalpis* induzem a apoptose de neutrófilos e modificam sua resposta inflamatória, favorecendo a infecção por *Leishmania chagasi*. Neutrófilos constituem a primeira linha de defesa contra infecções e participam da imunopatogênese das leishmanioses. Apesar do *L. longipalpis* ser o importante vetor da leishmaniose visceral no Brasil, a sua participação na resposta dos neutrófilos ainda é desconhecida. A injeção intraperitoneal do sonicado de glândula salivar (SGS) de *L. longipalpis* induziu um recrutamento precoce de neutrófilos em camundongos C57BL/6, que foi correlacionado com a cinética de apoptose e fagocitose por macrófagos. A incubação de neutrófilos inflamatórios peritoneais com SGS resultou na apoptose mediada por caspases e aumento da expressão de FasL na superfície dessas células *in vitro*. Essa apoptose foi revertida pelo pré-tratamento do SGS com proteases e anticorpos anti-saliva. Na presença da *L. chagasi*, o recrutamento de neutrófilos induzido pelo SGS também foi correlacionado com o aumento da apoptose. A combinação de *L. chagasi* com SGS aumentou a produção de TGF- $\beta$ 1, PGE<sub>2</sub> e MCP-1, enquanto diminuiu a produção de ROS em neutrófilos. Além disso, o SGS aumentou a viabilidade dos parasitas dentro dessas células. Sobrenadantes do cultivo de neutrófilos infectados com *L. chagasi* atraíram tanto macrófagos quanto neutrófilos. Em conjunto, nossos dados sugerem que o SGS desempenha um papel importante na resposta inflamatória dos neutrófilos, favorecendo a sobrevivência intracelular da *Leishmania*. Esse evento pode contribuir para a transmissibilidade desse parasita.

**Palavras-chaves:** *Lutzomyia longipalpis*; saliva; *Leishmania chagasi*; apoptose; neutrófilos.

Saliva from insect vectors is a rich source of pharmacologically active substances that interfere with host immune response. In the present study, we tested the hypothesis that *Lutzomyia longipalpis* salivary components enhance neutrophil apoptosis and modify its inflammatory response, favoring the *Leishmania chagasi* infection. Neutrophils take part in the first line of defense against infections and participate in the immunopathogenesis of Leishmaniasis. Despite the fact that *L. longipalpis* is an important vector of visceral Leishmaniasis in Brazil, its effects on neutrophil response are still unknown. Intraperitoneal injection of *Lu. longipalpis* salivary gland sonicate (SGS) induced an early neutrophil recruitment in C57BL/6 mice, which correlated with kinetics of apoptosis and phagocytosis by macrophages. Incubation of inflammatory peritoneal neutrophils with SGS resulted in apoptosis mediated by caspases and increase on FasL expression on cell surface *in vitro*. This apoptosis was abrogated by SGS pre-treatment with proteases and anti-saliva antibodies. In the presence of *L. chagasi*, SGS-induced neutrophil recruitment also correlated with increased apoptosis. Combination of *L. chagasi* and SGS increased TGF- $\beta$ 1, PGE<sub>2</sub> and MCP-1 production, while decreased ROS production in neutrophils. Moreover, SGS enhancing the parasite viability inside these cells. Supernatants from *L. chagasi*-infected neutrophils attracted both macrophages and neutrophils. Taken together, our data suggest that SGS plays an important role in the neutrophil inflammatory response, favoring the *Leishmania* survival. This event may contribute to the parasite transmissibility.

**Key words:** *Lutzomyia longipalpis*; saliva; *Leishmania chagasi*; apoptosis; neutrophils.



# INTERAÇÃO ENTRE NEUTRÓFILOS HUMANOS E MACRÓFAGOS CONTRIBUI NO DESFECHO DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

## INTERACTION BETWEEN HUMAN NEUTROPHILS AND MACROPHAGES CONTRIBUTES TO THE OUTCOME OF INFECTION BY *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

Lilian Maria Reis Afonso

Tese de Doutorado PPGPHE da FMB-UFBA. E-mail: [lafonso@bahia.fiocruz.br](mailto:lafonso@bahia.fiocruz.br)

Os neutrófilos são células que atuam na primeira linha de defesa do organismo contra patógenos e estão constitutivamente programadas para a morte celular por apoptose, sendo então, fagocitados por macrófagos. No presente estudo, avaliamos inicialmente o efeito da fagocitose de neutrófilos humanos em repouso: viáveis, apoptóticos ou necróticos, por macrófagos humanos infectados por *Leishmania amazonensis*. A interação com neutrófilos em repouso apoptóticos, mas não com células viáveis, leva a um aumento na taxa de infecção e carga parasitária em macrófagos. O favorecimento do crescimento intracelular do parasita em presença de neutrófilos apoptóticos foi dependente da produção de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub>. Por outro lado, houve uma diminuição da infecção dos macrófagos por *L. amazonensis*, assim como da carga parasitária, na presença de neutrófilos necróticos. A atividade leishmanicida nessas co-culturas foi dependente da produção de TNF- $\alpha$ , elastase neutrofílica (NE) e superóxido. A presença de neutrófilos ativáveis viáveis e apoptóticos pelo contato com fibronectina, mas não com outras proteínas de matriz extracelular, também reduz a taxa de infecção e a carga parasitária dos macrófagos infectados com *L. amazonensis*. O efeito microbicida nas co-culturas com neutrófilos ativáveis foi independente de contato e envolve a participação de enzimas neutrofílicas NE e MPO, bem como outros mediadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub> e ROI. Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a interação com neutrófilos humanos em repouso ou ativáveis é capaz de modular a resposta de macrófagos contribuindo para o desfecho da infecção por *L. amazonensis*.

**Palavras-chaves:** Neutrófilos; *Leishmania amazonensis*; Apoptose; Necrose; Fibronectina; Mediadores inflamatórios.

*The neutrophils are the first cells in the body defense against pathogens and are constitutively programmed to cell death by apoptosis, then they are uptaken by macrophages. In this study, we first evaluated the effect of phagocytosis of resting human neutrophils: viable, apoptotic or necrotic, by human macrophages infected with Leishmania amazonensis. The interaction with apoptotic resting neutrophils, but not with viable cells, lead to an increase in the rate of infection and parasite burden in macrophages. The growth of intracellular parasites in the presence of apoptotic neutrophils was dependent on the TGF- $\beta$  and PGE<sub>2</sub> production. Moreover, there was a decrease in L. amazonensis- macrophage infection and the parasite burden in the presence of necrotic neutrophils resting. Leishmanicidal activity in these co-cultures was dependent on the TNF- $\alpha$ , neutrophil elastase (NE) and superoxide production. The activation of viable and apoptotic neutrophils by contact with fibronectin, but not with other proteins of the extracellular matrix, also reduces the rate of infection and parasite burden of macrophages infected with L. amazonensis. The microbicidal effect in co-cultures with activated apoptotic or viable neutrophils was independent on contact and involves the participation of neutrophil enzymes NE and MPO as well as other pro-inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub> and ROI. The results presented in this study demonstrate that the interaction with human resting or activated neutrophils is able to modulate the macrophage response contributing for the outcome of infection by L. amazonensis.*

**Key words:** Neutrophil; *Leishmania amazonensis*; Apoptosis; Necrosis; Fibronectin; Inflammatory mediators

# ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, DIFERENCIAÇÃO E USO TERAPÊUTICO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS OBTIDAS DA POLPA DENTÁRIA MURINA

## ISOLATION, CHARACTERIZATION, DIFFERENTIATION AND THERAPEUTIC USE OF ADULT STEM CELLS OBTAINED FROM MOUSE DENTAL PULP

Elisalva Teixeira Guimarães

Tese de Doutorado PPgPHE da FMB-UFBA. *C-elo: elisalvaguiaraes@gmail.com*

Diversos estudos têm demonstrado que a polpa dentária humana é uma fonte de células-tronco. Neste trabalho nós caracterizamos células obtidas da polpa do dente de camundongos (CTMDC) e o seu efeito terapêutico em um modelo de diabetes em camundongos. O tecido pulpar foi separado do dente incisivo e cultivado *in vitro*. Foi investigada a expressão de marcadores de células-tronco nas culturas celulares obtidas e a integridade genética. A diferenciação adipogênica e osteogênica foi induzida após o cultivo das células em meios específicos. Camundongos foram tratados com 80 mg/kg de estreptozotocina (ETZ) e transplantados após 10 dias com CTMDC ou salina. Os níveis de glicose no sangue, proteinúria, glicosúria e creatinina foram avaliados através de dosagens bioquímicas. A migração celular para o pâncreas foi analisada por imunofluorescência. A diferenciação espontânea em adipócitos foi confirmada pela marcação com óleo vermelho, sudan black e por microscopia eletrônica. As CTMDC são aderentes ao plástico, polimórficas e altamente proliferativas. Algumas células alongadas adquiriram a capacidade de contração após 28 dias de cultura. As CTMDC apresentaram um cariótipo normal até a quinta passagem. A expressão de marcadores hematopoiéticos não foi detectada, enquanto que foi observada a expressão dos marcadores mesenquimais CD90, Sca-1, STRO-1 e CD73. Na análise da expressão de marcadores embrionários observou-se a expressão de SSEA-1 por imunofluorescência e dos fatores de transcrição REX-1 e OCT-4, mas não de NANOG, por RT-PCR. A diferenciação osteogênica e adipogênica foi observada após duas semanas de cultivo em meios específicos. Dezesesseis dias após o transplante de CTMDC, camundongos com hiperglicemia induzida por ETZ apresentavam os níveis de glicose no sangue menores quando comparados com o grupo controle injetado apenas com salina. Os níveis de glicosúria, proteinúria e creatinina foram significativamente reduzidos nos camundongos transplantados com CTMDC. Análises de imunofluorescência revelaram a presença de células GFP<sup>+</sup> no pâncreas. Em um dos isolados de polpa dentária, as CTMDC apresentaram uma morfologia alterada, com a predominância de células arredondadas e múltiplos vacúolos citoplasmáticos. A positividade para o *oil red* e para o *sudan black* confirmaram a diferenciação em adipócitos. Níveis elevados de adiponectinas e triglicérides foram detectados no sobrenadante destas culturas. A análise por microscopia eletrônica confirmou a presença de vacúolos citoplasmáticos ricos em lipídeos. No sobrenadante dos pré-adipócitos foram detectados níveis significativos de óxido nítrico. Estes resultados confirmam que as CTMDC possuem a plasticidade e fenótipo que efetivamente as define como células-tronco e indicam seu potencial terapêutico.

**Palavras-chaves:** Células-tronco; polpa dentária; camundongo; fenótipo; diferenciação; diabetes; terapia celular; adipócito.

*Several studies have demonstrated that human dental pulp is a source of stem cells. Here we characterized cells obtained from mouse dental pulp (mDPSC) and their therapeutic effects in a diabetes mouse model. The pulp tissue was separated from incisor teeth and cultured in vitro. Expression of stem cell markers and genetic integrity were investigated. Adipogenic and osteogenic differentiation were induced using proper culture conditions. Mice were treated with 80 mg/kg streptozotocin (STZ) and transplanted after 10 days with mDPSC or saline. Blood glucose, proteinuria, glycosuria, and creatinine levels were evaluated. Cell migration to the pancreas was evaluated by immunofluorescence analysis. Spontaneous adipogenic differentiation was confirmed by oil red O or Sudan black stain and by transmission electron microscopy. mDPSC are plastic-adherent, polymorphic and highly proliferative. Some elongated cells spontaneously acquired a contraction capacity. Proliferating mDPSC had a normal karyotype in the 5<sup>th</sup> passage. Expression of hematopoietic cell markers was undetectable whereas the mesenchymal stem cell markers CD90, Sca-1, STRO-1 and CD73 were observed. The analysis of embryonic stem cell markers in mDPSC showed high positivity for SSEA-1. In addition, transcription factors REX-1 and OCT-4, but not NANOG, were detected in mDPSC by RT-PCR. Adipogenic and osteogenic differentiation were observed in the culture after two weeks under chemically defined conditions. Sixteen days after transplantation, blood glucose levels were reduced in hyperglycemic mice treated with mDPSC compared to the control group. The levels of glycosuria, proteinuria, and creatinine were significantly reduced in transplanted mice. Immunofluorescence analyses of the pancreas revealed that the GFP-positive cells migrate to the pancreatic islets. In one of the isolated cultures, mDPSC cells started to show altered morphology, with predominant rounded shape and large cytoplasmic vacuoles. Oil red O and sudan black positive lipid droplets confirmed the adipogenic differentiation. High levels of adiponectin and triglycerides were detected in culture supernatants of differentiated adipocytes compared to undifferentiated cells. Significant levels of nitric oxide were detected in the supernatant of the pre-adipocytes. Electron microscopy confirmed the presence of lipid droplets. These results confirm that mDPSC possess plasticity and phenotype that effectively define them as stem cells and indicate their therapeutic potential.*

**Key words:** Stem cells; dental pulp; mice; phenotype; differentiation; diabetes; cell therapy; adipocyte.

# ABORDAGEM PROTEÔMICA PARA IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE OU ESTABELECIMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

## PROTEOMIC IDENTIFICATION OF MOLECULES INVOLVED ON ESTABLISHMENT AND CONTROL OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Juliana Perrone Bezerra de Menezes

Tese de Doutorado PPgPHE da FMB-UFBA. C-elo: [elisalvaguimaraes@gmail.com](mailto:elisalvaguimaraes@gmail.com)

Camundongos da linhagem CBA/J são resistentes à infecção por *Leishmania major* e susceptíveis à *Leishmania amazonensis*. Adicionalmente, macrófagos de CBA/J controlam a infecção por *L. major* e são permissivos a *L. amazonensis*, sugerindo um papel importante destas células na determinação do curso da infecção por *Leishmania*. Posteriormente, utilizando microarranjo de cDNA, foi demonstrado que macrófagos infectados por *L. amazonensis* e *L. major* expressam diferentes conjuntos de genes relacionados com a resposta inicial à infecção por *Leishmania*. A tecnologia de microarranjo é útil para identificar moléculas em nível transcricional. Entretanto, os níveis de transcritos primários nem sempre se correlacionam com os níveis da proteína correspondentes devido a eventos de regulação pós-transcricional. Estudo de proteômica realizado em nosso laboratório demonstrou que há expressão diferencial de um pequeno número de proteínas após a infecção de macrófagos peritoneais inflamatórios por *L. amazonensis* ou *L. major*. Com o objetivo de avaliar melhor a resposta do macrófago à infecção por *Leishmania*, utilizamos macrófagos derivados de precursores de medula óssea (BMM?), uma vez que estes não estão pré-ativados por tioglicolato e as culturas são sincronizadas e mais homogêneas. Inicialmente, estudos de cinética foram realizados para comparar a capacidade de *L. amazonensis* e *L. major* de infectar BMM?. Neste trabalho, utilizando uma abordagem proteômica, foi avaliada a expressão diferencial de proteínas de BMM? após 6 e 24h de infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*, a partir da caracterização de peptídeos por abordagem MudPIT LC-MS/MS. Os resultados de 6 experimentos independentes foram analisados e mostram que 382 proteínas foram diferentemente expressas em células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. major*. Estas proteínas estão envolvidas em processos celulares como morte celular, modificações pós-traducionais, metabolismo de lipídios, transporte molecular, metabolismo de aminoácidos, bioquímica de pequenas moléculas, sinalização celular, organização celular, movimento celular, ciclo celular, dano celular e resposta imune mediada por célula. Utilizando o IPA, foi demonstrado que das 4 principais redes criadas, a rede relacionada com metabolismo de lipídios e bioquímica de pequenas moléculas apresenta a maioria das proteínas com expressão aumentada em células infectadas por *L. amazonensis*, quando comparadas com aquelas infectadas por *L. major*, enquanto a rede relacionada com sinalização celular e organização e movimento celular apresenta a maioria das proteínas com expressão aumentada em células infectadas por *L. major*, quando comparadas com aquelas infectadas por *L. amazonensis*. Esses resultados mostram que *L. amazonensis* e *L. major* modulam de forma diferente diversas funções do macrófago. Os dados sugerem que *L. amazonensis* não induz a ativação da célula, como descrito anteriormente em estudos de microarranjo. Por outro lado, *L. major* modula vias de sinalização celular, levando a uma resposta compatível com a ativação celular. Esses resultados corroboram estudos anteriores que demonstraram diferenças na resposta do macrófago à *L. amazonensis* e *L. major* observadas em estudos anteriores. Esses dados apontam para um papel central da natureza do parasito na modulação da resposta do macrófago à infecção. Análises por *western-blot* estão sendo realizadas para validar as diferenças na expressão protéica observadas nos estudos de proteômica em larga escala.

**Palavras-chaves:** Proteômica; Macrófago; *L. amazonensis*; *L. major*.

CBA/J mice are resistant to *Leishmania major* and susceptible to *Leishmania amazonensis*. In addition, CBA/J macrophages control *L. major* infection and are permissive to *L. amazonensis*, suggesting an important role for macrophages on the determination of *Leishmania* infection outcome. Using microarray approach we showed that *L. amazonensis*- and *L. major*-infected macrophages differentially express very few numbers of genes related to the initial response to *Leishmania* infection. Although microarray is useful to identify molecules at transcriptional level, it is necessary to associate expressed genes to their respective proteins. Proteomic experiments using inflammatory macrophages also demonstrated that a small number of proteins were differently expressed after *L. amazonensis* and *L. major* infection. In order to better evaluate the macrophage response to *Leishmania* infection, we used bone marrow derived macrophages (BMMÖ) since they are not pre-activated by thioglycollate, and their cultures are synchronized and homogeneous. First, we performed kinetic studies and compared the capacity of *L. amazonensis* and *L. major* to infect BMMÖ. In this study, using proteomic approach, we evaluated the differential expressed proteins at 6 and 24h of *L. major* or *L. amazonensis* infection on BMMÖ. Protein extracts were obtained to identify peptides by LC-MS/MS in a MudPIT approach. The results from 6 independent experiments were analyzed to identify the differentially expressed proteins. The results show that 382 proteins were differently expressed in *L. amazonensis*- or *L. major*-infected cells. These proteins are involved in cell death, post-translational modification, lipid metabolism, molecular transport, amino acid metabolism, small molecule biochemistry, cell signaling, cellular assembly and organization, cellular movement, cell cycle, organismal injuries and abnormalities and cell-mediated immune response. Using IPA analyses, we showed that

*from the top 4 networks created, the one related to lipid metabolism and small molecule biochemistry has most of the proteins with higher expression levels in L. amazonensis-infected cells, when compared to L. major-infected cells, while the one related to cell signaling, cellular assembly and organization and cellular movement has most of the proteins with higher expression levels in L. major-infected cells, when compared to L. amazonensis-infected cells. These results show that L. amazonensis and L. major differentially modulate many macrophage functions. In response to L. amazonensis macrophage did not strictly fall into activation profiles, as previously described by others using microarray studies. On the other hand L. major modulate cell-signaling network supporting a kind of response compatible with cell activation. These results corroborate the previous observed differences in macrophage response to L. amazonensis and L. major. Taken together, the data point out to a pivotal role for the parasite on determining the subsequent immune response and course of infection. Current western-blot analyses are been performed to corroborate the differences on expression at protein level detected by high throughput proteomic studies.*

Key words: Proteomics; Macrophages; L. amazonensis; L. major.



# **PAPEL DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS DO TIPO 5-HT<sub>3</sub> LOCALIZADOS NO NÚCLEO SEPTAL MEDIAL/BANDA DIAGONAL DE BROCA SOBRE O CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS**

## **ROLE OF 5-HT<sub>3</sub> RECEPTORS LOCALIZED IN THE MEDIAL SEPTAL AREA/ DIAGONAL BAND OF BROCA OVER THE CONTROL OF BLOOD PRESSURE IN RATS**

Lilian Simone Urzedo Rodrigues

Tese de Doutorado PPgPHE da FMB-UFBA. C-elo: [liliasimoner@yahoo.com.br](mailto:liliasimoner@yahoo.com.br)

Diversos estudos têm mostrado a participação das vias serotoninérgicas tanto centrais, quanto periféricas no controle cardiovascular. Os principais receptores serotoninérgicos envolvidos na regulação cardiovascular são do tipo 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>7</sub>. A ativação serotoninérgica em diferentes áreas cerebrais resulta tanto em aumento, quanto diminuição da pressão arterial. As principais áreas cerebrais relacionadas com os efeitos cardiovasculares induzidos pela estimulação serotoninérgica são: região rostro ventrolateral do bulbo, núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo dorsal motor do vago, núcleo do trato solitário. Entre as estruturas prosencefálicas, tem sido mostrado que o complexo núcleo septal medial/banda diagonal de Broca (SM/vDB) desempenha importante papel no controle do equilíbrio hidrossalino e cardiovascular. Desde que esta área apresenta receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub> e recebe aferências serotoninérgicas do núcleo mediano da rafe, os objetivos do presente estudo foram: a) investigar o papel dos receptores 5-HT<sub>3</sub> localizados no SM/vDB sobre o controle cardiovascular b) analisar o padrão de expressão de c-Fos no cérebro de ratos induzido pelo bloqueio farmacológico dos receptores 5-HT<sub>3</sub> presentes no SM/vDB. Ratos Wistar (280-300g) anestesiados com cetamina/xilazina (80/11,5 mg/kg; i.p.) foram submetidos a implante de cânulas no SM/vDB. Os animais foram novamente anestesiados 48 h antes dos experimentos para cateterização da carótida e veia femoral. Na sessão experimental a pressão pulsátil (PAP) foi registrada durante 30 minutos para cálculo dos valores basais de pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC). A seguir os animais receberam no SM/vDB microinjeções de m-CPBG (160 nmol), ondansetrona (160, 80 e 40 nmol) ou NaCl 0,9%, em um volume de 0,2 ml e a PAP foi registrada durante mais 100 minutos. Os dados são expressos como média ± EPM das variações da PAM e da FC. Microinjeções de ondansetrona, um antagonista seletivo do receptor 5-HT<sub>3</sub>, nesta área causou aumento dose-dependente da pressão arterial. Essa elevação foi bloqueada pela prazosina (iv), um antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico, e reduzida pela microinjeção prévia de losartan, um antagonista AT1, nessa área do cérebro. No entanto, microinjeções do m-CPBG, agonista dos receptores do tipo 5-HT<sub>3</sub>, nesta área não tem qualquer efeito sobre a pressão arterial. A bradicardia reflexa evocada por fenilefrina (i.v.) foi significativamente maior após microinjeções de ondansetrona nesta área do cérebro, mas não a taquicardia evocada por nitroprussiato de sódio (i.v.), sugerindo um aumento do componente parassimpático do barorreflexo. Além disso, a injeção de ondansetrona no SM/vDB aumenta a expressão de c-Fos em diferentes áreas do encéfalo relacionadas ao controle da pressão arterial, incluindo áreas límbicas (parte ventral do núcleo do leito da estria terminal e amígdala central), estruturas hipotalâmicas (parte parvocelular do núcleo paraventricular, hipotálamo lateral, núcleo dorsomedial e parte anterodorsal da área préóptica), estrutura mesencefálica (parte ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal), e áreas romboencefálicas (parte medial do núcleo do trato solitário, o núcleo parabraquial lateral e área rostral ventrolateral do bulbo). Os dados sugerem que os receptores 5-HT<sub>3</sub> no SM/vDB têm uma ação tônica inibitória sobre o simpático que é mediada por meio da liberação local de angiotensina no SM/vDB. Estes receptores também exercem uma ação inibitória sobre o componente cardiovagal do barorreflexo. Além disso, pode-se sugerir que a supressão da atividade do receptor 5-HT<sub>3</sub> no SM/vDB dá origem a uma ativação seqüencial de vias descendentes que permitem as estruturas límbicas ativarem estruturas do hipotálamo capazes de recrutar e modular áreas romboencefálicas diretamente relacionadas com as funções cardíacas e vasculares, levando à resposta hipertensiva observada aqui. Também é razoável sugerir que: 1) a atividade inibitória sobre a pressão arterial, tonicamente exercida pelo SM/vDB, depende da integridade funcional dos receptores 5-HT<sub>3</sub> e 2) esta atividade inibitória pode oscilar espontaneamente e de forma intermitente, como parte funcional da complexa rede neuronal que controla a pressão arterial em diferentes circunstâncias fisiológicas.

**Palavras-chaves:** pressão arterial; área septal; 5-HT<sub>3</sub>; simpático; angiotensina II.

*Many studies have shown that both central and peripheral serotonin play a role in cardiovascular control, mainly through 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptors. The activation of brain serotonergic receptors can either increase or decrease arterial blood pressure. The areas involved in such cardiovascular response include: rostroventrolateral medulla, paraventricular nucleus, dorsal motor nucleus of vagus, nucleus of the solitary tract. Among the prosencephalic areas, medial septal area and diagonal band of Broca (MS/vDB) have been shown to control hydrossaline balance and cardiovascular responses. Since this area contains 5-HT<sub>3</sub> receptors and receives afferent serotonergic neurons from median raphe nucleus, the aimed of the present study was: a) to investigate the role of 5-HT<sub>3</sub> receptors located in the MS/vDB on cardiovascular control b) to analyze the pattern of c-Fos expression induced by the blockage of 5-HT<sub>3</sub> in the MS/vDB. Wistar rats (280-300g), anesthetized with ketamine/xilazine (80/11.5 mg/kg; i.p.), had a stainless cannula implanted in MS/vDB. The animals were anesthetized again, 48h before experimental sessions, for carotid and femoral vein catheterization. The baseline pulsatile*

blood pressure (PBP) was recorded for 30 minutes and used to calculate mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR). Following this period, the animals received microinjections into MS/vDB of mCPBG (160 nmol), ondansetron (160, 80 and 40 nmol) or NaCl 0.9% and the PBP were recorded for additional 100 minutes. The data are expressed as mean  $\pm$  SEM of delta of MAP and HR. Microinjections of ondansetron, a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, into this area caused a dose-dependent increase in blood pressure. This rise was attenuated by the blockade of alpha-adrenoceptors with prazosin (i.v.) and blunted by the prior microinjection of losartan, an ATI antagonist, into this brain area. However, microinjections of the 5-HT<sub>3</sub> agonist mCPBG into this area failed to have any effect on blood pressure. The reflex bradycardia evoked by phenylephrine (i.v.) was significantly increased after microinjections of ondansetron into this brain area, but not the tachycardia evoked by sodium nitroprusside (i.v.), suggesting that the parasympathetic drive of baroreflex has been enhanced. Furthermore, injection of ondansetron into the MS/vDB increases c-Fos expression in many different brain areas related to the control of blood pressure including limbic areas (ventral part of the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdala), hypothalamic structures (parvocellular portion of the paraventricular nucleus, lateral hypothalamus, dorsomedial nucleus and anterodorsal part of the preoptic area), mesencephalic structure (ventrolateral part of the periaqueductal gray matter), and rhombencephalic areas (medial part of the nucleus of the solitary tract, the lateral parabrachial nucleus and the rostroventral lateral medulla). The data suggest that 5-HT<sub>3</sub> receptors at this brain level have a tonic sympathoinhibitory action that is mediated via the local release of angiotensin in the MS/vDB. This tonic 5-HT<sub>3</sub> receptor drive also exerts an inhibitory action on the cardiac parasympathetic component of the baroreflex. Also, it is suggested that suppression of the 5-HT<sub>3</sub> receptor activity in the MS/vDB gives rise to a sequential activation of descending pathways that allow the limbic sectional parts of this particular network to activate hypothalamic structures able to recruit and modulate rhombencephalic areas directly commanding cardiac and vascular functions, leading to the hypertensive response observed here. It is also reasonable to suggest that: 1) the inhibitory drive on blood pressure tonically exerted by the MS/vDB depends on the functional integrity of 5-HT<sub>3</sub> receptors and 2) this inhibitory drive may oscillate spontaneously and intermittently as a functional regulatory part of the complex central neuronal network that controls blood pressure under different physiological circumstances.

**Key words:** Arterial blood pressure; Septal Area (SA); 5-HT<sub>3</sub> receptor; sympathetic drive; angiotensin II

# TERAPIA CELULAR EM CAMUNDONGOS COM CARDIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA: MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MELHORA DA MIOCARDITE CHAGÁSICA CRÔNICA EXPERIMENTAL

## CELL THERAPY IN MICE WITH CHRONIC CHAGASIC CARDIOMYOPATHY: MECHANISM INVOLVED IN THE IMPROVEMENT OF EXPERIMENTAL CHRONIC CHAGASIC MYOCARDITIS

Ricardo Santana de Lima

Tese de Doutorado PPgPHE da FMB-UFBA. C-elo: rsantanade@gmail.com

A cardiomiopatia chagásica crônica é uma das principais causas de insuficiência cardíaca nos países latino-americanos. Cerca de 30% dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* desenvolvem essa forma grave e sintomática da doença, caracterizada pela presença de uma resposta inflamatória intensa seguida de fibrose no coração. Foi demonstrado previamente que o transplante de células da medula óssea (BMC) melhora a inflamação e a fibrose em corações de camundongos chagásicos crônicos. Neste trabalho foram investigadas alterações da expressão gênica no coração de camundongos chagásicos crônicos submetidos ou não à terapia BMC. Camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com *T. cruzi* (6 meses) foram transplantados com células mononucleares da medula óssea (BMC) ou solução salina intravenosamente (i.v.) e sacrificados após 2 meses. RNA foi extraído de corações de animais controles normais e chagásicos. Análise de microarranjos de DNA foi realizada utilizando uma matriz de 27.400 cDNAs. Imunofluorescência e análises morfométricas foram realizadas em secções dos corações. Foram encontradas alterações significativas na expressão de ~12% dos genes amostrados. Genes com expressão aumentada nos corações chagásicos foram associados com as respostas imune-inflamatória (quimiocinas, moléculas de adesão, catepsinas e moléculas de MHC) e fibrose (componentes da matriz extracelular, lisil oxidase e Timp1). Quando corações chagásicos de animais tratados com BMC foram comparados com o de animais normais, cerca de 90% das alterações gênicas não foram encontradas. Muitos dos genes com expressão modulada pelo tratamento com BMC foram relacionados à inflamação e fibrose. Imunofluorescência e análise morfométrica confirmaram os efeitos moduladores da terapia com BMC no padrão de resposta inflamatória e na expressão de moléculas de adesão. Nossos resultados demonstram um importante efeito imunomodulador do BMC e indicam fatores potencialmente relevantes envolvidos na patogênese da doença, que podem constituir novos alvos terapêuticos para esta doença. Para investigar a contribuição natural das células da medula óssea nas lesões no coração e músculo esquelético durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*, camundongos quiméricos foram gerados através do transplante de células da medula óssea GFP<sup>+</sup> em camundongos receptores do tipo selvagem letalmente irradiados que foram infectados com *T. cruzi* um mês após o transplante. A migração de células derivadas da medula óssea para o coração e músculo esquelético foi vista durante e após a fase aguda da infecção, uma vez que o infiltrado inflamatório era composto por células GFP<sup>+</sup>. Cardiomiócitos e células endoteliais GFP<sup>+</sup> foram encontrados nas secções de coração de camundongos quiméricos infectados. Além disso, um grande número de fibras GFP<sup>+</sup> foi observado no músculo esquelético de camundongos quiméricos em diferentes momentos após a infecção por *T. cruzi*. Nossos resultados reforçam o papel das células derivadas da medula óssea na regeneração tecidual em lesões

**Palavras-chaves:** Terapia celular; doença de Chagas; cardiopatia; transplante; células de medula óssea; camundongo.

*Chronic chagasic cardiomyopathy is a leading cause of heart failure in Latin American countries. About 30% of Trypanosoma cruzi-infected individuals develop this severe symptomatic form of the disease, characterized by intense inflammatory response followed by fibrosis in the heart. We have previously shown that bone marrow cell (BMC) transplantation improves inflammation and fibrosis in hearts of mice with chronic Chagas' disease. Here we investigated alterations of gene expression in the hearts of chronic chagasic mice submitted or not to BMC therapy. C57Bl/6 mice chronically infected with T. cruzi (6 months) were transplanted with bone marrow mononuclear cells (BMC) or saline solution intravenously (i.v.) and sacrificed 2 months later. RNA was extracted from the hearts of normal controls and chagasic mice. DNA microarray analysis was performed using an array of 27,400 mouse cDNAs. Immunofluorescence and morphometric analyses were performed in heart sections. We found significant alterations in expression of ~12% of the sampled genes. Extensive upregulations in chagasic hearts were associated with immune-inflammatory responses (chemokines, adhesion molecules, cathepsins and MHC molecules) and fibrosis (extracellular matrix components, lysyl oxidase and Timp1). When BMC-treated chagasic hearts were compared to normal mice, about 90% of the alterations were not found. Many of the genes with expression modulated by BMC were related to inflammation and fibrosis. Immunofluorescence and morphometric analyses confirmed the modulatory effects of BMC therapy in the pattern of inflammatory response and expression of adhesion molecules. Our results demonstrate an important immunomodulatory effect of BMC and indicate potentially relevant factors involved in the pathogenesis of the disease which may provide new therapeutic targets. To investigate the natural contribution of bone marrow cells on lesions in the heart and striated muscle during acute T. cruzi infection, chimeric mice were generated by transplanting GFP<sup>+</sup> bone marrow cells into lethally irradiated wild-type recipient mice and infected with T. cruzi one month after transplantation. Migration of bone marrow-derived cells to the heart and striated muscle was seen during and after the acute phase of infection, since the inflammatory infiltrate was composed by GFP<sup>+</sup> cells. GFP<sup>+</sup> cardiomyocytes and endothelial cells were found in the heart sections of chimeric chagasic mice. In addition, a large number of GFP<sup>+</sup> myofibers were seen in the striated muscle of chimeric mice at different time points after infection. Our results reinforce the role of bone marrow-derived cells in tissue regeneration in lesions caused by T. cruzi infection.*

**Key words:** Cellular therapy; Chagas' disease; cardiopathy; transplant; bone marrow cell; mice.

# ENVOLVIMENTO DA VIA FAS/FASL NA PATOGÊNESE E RESPOSTA TERAPÊUTICA DA LEISHMANIOSE HUMANA.

## INVOLVEMENT OF THE FAS/FASL PATHWAY IN BOTH PATHOGENESIS AND THERAPEUTIC RESPONSE IN HUMAN LEISHMANIASIS.

Gilvanéia Silva Santos

Tese de Doutorado PPgPHE da FMB-UFBA. C-elo: gilvaneia@hotmail.com

A apoptose esta envolvida em uma variedade de funções fisiológicas, assim como em alguns processos patológicos, incluindo doenças auto-imunes e doenças infecciosas. Evidências sugerem que a apoptose pode desempenhar significativo papel na patogênese da leishmaniose. No modelo murino de infecção, a via de sinalização Fas/FasL tem sido descrita como crucial para resistência à infecção por *Leishmania*, independente de uma resposta imune do tipo Th1. Em contraste, estudos tem sugerido a participação da via Fas/FasL na formação da úlcera na leishmaniose cutânea humana (LC). Nesse estudo, nós investigamos o envolvimento da via Fas/FasL na susceptibilidade, gravidade da doença e resposta terapêutica em pacientes com leishmaniose cutânea e visceral (LV). Um total de 136 pacientes com LC (oriundos das áreas endêmicas de Jequié e Jiquiriçá - BA), 49 pacientes com LV, 98 controles DTH+ e 98 controles DTH- (oriundos de São Luís - MA), 265 pacientes com LV (oriundos de Teresina - PI) e 103 controles urbanos de Salvador - BA foram recrutados no período entre 2002-2008. Os polimorfismos FAS -670A/G e FASL -844T/C foram genotipados por PCR-RFLP. A expressão membranar de Fas/FasL e subpopulações linfocitárias (T, B, NK, CD4, CD8) foram quantificadas *ex vivo* em PBMC por citometria de fluxo. Os níveis solúveis de (s)Fas e (s)FasL foram mensurados por ELISA e CBA, respectivamente. A associação entre expressão de Fas/FasL, genótipos, dados clínicos, imunológicos e demográficos foi determinada usando análises univariadas e análises Bayesianas multivariadas. Nesse estudo observou-se que os SNPs FAS -670 e FASL -844 foram associados com susceptibilidade à infecção por *Leishmania* em indivíduos exposto. A frequência do genótipo GG para o SNP FAS -670 foi significativamente aumentada em pacientes com LV (45.8 %) quando comparados com controles DTH+ (28.6%,  $p=0.039$ ; OR=2.12 [1.03-4.3] e associado com risco de desenvolver LV por infecção com *Leishmania chagasi*, enquanto os genótipos CT + TT para o SNP FASL -844 foram associados com risco aumentado para desenvolver LV (OR = 3.83, [1.46-10.02];  $p=0.0046$ ). Na LC, a presença de linfadenopatia, tamanho da lesão, tempo de cura e número de ciclos de tratamento (Sb<sup>v</sup>) foram significativamente aumentados em pacientes com o genótipo GG através da análise univariada. Nossos dados também revelaram uma diferença em relação ao gênero no curso clínico da leishmaniose e distribuição dos genótipos para o SNP -670 do gene FAS. As análises Bayesianas confirmaram as associações independentes entre os genótipos de FAS, gênero, resposta imune, gravidade da doença e resposta terapêutica. Entre os pacientes com LV de Teresina-PI, nenhuma associação foi encontrada entre FAS/FASL SNPs e gravidade da doença. Entretanto, os níveis de sFas foram significativamente elevados nos pacientes co-infectados com HIV-*Leishmania* e os níveis de sFasL solúvel foram significativamente associados com gravidade da doença em pacientes com LV. Assim, nós concluímos que a via de apoptose Fas/FasL desempenha um significativo papel (e provavelmente protetor) na patogênese e resposta terapêutica da leishmaniose humana.

**Palavras-chaves:** Leishmaniose humana; Apoptose; Biomarcadores; Polimorfismos.

Apoptosis is involved in a variety of physiological functions, as well as in some pathological processes, including immune disorders and infectious disease. Evidence suggests that apoptosis may play a significant role in the pathogenesis of leishmaniasis. In the murine model, the Fas/FasL signaling pathway has been shown to be crucial to resistance to *Leishmania* infection, independent of a Th1 immune response. In contrast, Fas/FasL have been suggested to participate in ulcer formation in human cutaneous leishmaniasis (CL). In this study, we investigated the involvement of the Fas/FasL pathway in disease susceptibility, disease severity and therapeutic response in patients with cutaneous and visceral leishmaniasis (VL). A total of 136 patients with CL (endemic areas of Jequié and Jiquiriçá-BA), 49 patients with VL, 98 DTH+ subjects and 98 DTH- controls (São Luís - MA), 265 patients with VL (Teresina-PI) and 103 healthy controls (Salvador-BA) were recruited from 2002-2008. FAS -670A/G and FASL -844T/C genotyping were performed by PCR-RFLP. Membrane Fas/FasL expression and lymphocyte subpopulations (T, B, NK, CD4, CD8) were quantified *ex vivo* in PBMC by flow cytometry. Soluble (s)Fas and (s)FasL were measured by ELISA and CBA, respectively. Association between Fas/FasL expression, genotypes, clinical immunological and demographic data was determined using univariate analysis and Bayesian Network analysis. We found that SNPs FAS -670 and -844 FASL were associated with susceptibility to VL in *Leishmania*-exposed individuals. FAS -670 GG genotype was significantly increased (45.8 %) in patients, as compared to DTH+ controls (28.6%,  $p=0.039$ ; OR = 2.12, [1.03-4.3] to develop VL upon infection with *Leishmania chagasi*, whereas FASL -844 CT + TT genotypes were associated with an increased risk for the development of visceral leishmaniasis (OR = 3.83, [1.46-10.02];  $p=0.0046$ ). In CL, lymphadenopathy, lesion size, healing time and number of treatment cycles (Sb<sup>v</sup>) were significantly increased in FAS -670 GG homozygotes by univariate analysis. Our data also showed a gender difference in relation to the clinical outcome of leishmaniasis and FAS -670 genotype distribution. Bayesian Network analysis supported independent associations between FAS genotype, gender, immune response, disease severity and therapeutic response. In VL patients from Teresina-PI, there was no association between FAS/FASL SNPs and disease severity. However, the levels of sFas were significantly increased in VL/HIV co-infected patients and soluble FasL levels were significantly associated with disease severity in VL patients. Thus, we conclude that the Fas/FasL pathway plays a significant (and probably protective) role in both pathogenesis and therapeutic response of human leishmaniasis.

**Key words:** Human Leishmaniasis, Apoptosis, Biomarkers, Polymorphisms.



## ESTUDO MOLECULAR DOS VÍRUS B E C DA HEPATITE DAS REGIÕES NORTE E NORDESTE DO BRASIL

Hermes Pedreira da Silva Filho

Tese de Doutorado PPgPHE da FMB-UFBA. C-elo: pedreirahermes@hotmail.com

Infecções pelos vírus B e C das hepatites constituem um significativo problema de saúde pública em todo mundo. Mais de 350 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo VHB e 170 milhões pelo VHC. No Brasil, a prevalência de pessoas infectadas pelo VHB varia de baixa endemicidade até alta, acima de 7%, e estima-se que 1,5% da população esteja infectada pelo VHC (WHO). Estudos recentes tem demonstrado consideráveis variações entre os isolados do VHB, confirmando a diversidade de genótipos do vírus circulantes e o surgimento de mutações no genoma viral que podem ter impacto na resposta terapêutica e imune. Informações sobre a diversidade genética do VHB serão de grande valor para determinar fatores de risco associados a disseminação do vírus e auxiliar na adoção de medidas de prevenção e terapêutica. A infecção pelo VHC tornou-se um sério problema de saúde pública desde que não existe uma vacina disponível e o tratamento é extremamente caro para os órgãos públicos como desgastante para o paciente. Este trabalho utilizou as ferramentas moleculares e de epidemiologia no estudo destes vírus para caracterizar molecularmente os vírus B e C das hepatites nas Regiões Norte e Nordeste, particularmente na Bahia, através de sequenciamento de DNA e análises filogenéticas. Amostras de pacientes provenientes da Bahia, Acre, Rondonia, Amazonas, Maranhão e Tocantins foram analisadas. Sequencias das regiões pré-S/S e pré-Core/Core do VHB e NS5b, 5UTR, E1 e Core do VHC foram utilizadas para classificação genotípica e análise filogenética. Os genótipos mais frequentes para o VHB foram A (57%), D (10%) e F(33%) na Bahia e nas amostras da região Norte. Na região Norte a co-infecção com VHB genótipo F e o vírus D está fortemente associada à pior evolução da doença. Não foi possível estabelecer uma ligação genótipo específico com a evolução da infecção, e determinar a presença de mutantes relacionados à resposta terapêutica e ao escape imunológico. Com relação ao VHC, a subtipagem dos isolados foi realizada através do sequenciamento da região NS5b e 5UTR (n=230). Os sub-genótipos mais frequentes foram 1a(45,6%), 1b (46,9%), 3a (6,5%) e 2a/b(0,8%). As regiões E1 e Core também foram sequenciadas e no futuro serão utilizadas para avaliar possíveis mutações. O presente estudo mostra que a aplicação de protocolos de sequenciamento, bioinformática e filogenia são indispensáveis para a compreensão da epidemiologia molecular dos vírus das hepatites.

**Palavras-chaves:** Hepatite; Hepatite B; Hepatite C; Genótipo; Filogenia.

*Infections by viruses of hepatitis B and C constitute a significant public health problem worldwide. More than 350 million people are chronically infected with HBV and 170 million by HCV. In Brazil, the prevalence of people infected with HBV ranges from low to high endemicity, up 7%, and it is estimated that 1.5% of the population is infected with HCV (WHO). Recent studies have shown considerable variation among isolates HBV, confirming the diversity of circulating genotypes of the virus and the emergence of mutations in the viral genome that may impact on therapeutic response and immune. Information on the genetic diversity of HBV will be of great value to determine risk factors associated with the spread of the virus and to assist in the adoption of measures for prevention and therapy. HCV infection has become a serious public health problem since there is no vaccine available and treatment is extremely expensive for public agencies as stressful for the patient, as well as the treatment efficiency is directly related to viral genotype. This study used molecular epidemiology tools to characterize molecularly the viruses of hepatitis B and C in the North and Northeast, particularly in Bahia, through DNA sequencing and phylogenetic analysis. Samples from Bahia, Acre, Rondônia, Amazonas, Maranhão and Tocantins were analyzed. Sequences of the regions pre-S/S and HBV core / pre-core and NS5B, 5UTR, HCV Core and E1 were used for genotypic classification and phylogenetic analysis. The most frequent HBV genotypes were A (57%), D (10%) and F (33%) in Bahia and in the samples from the North region. In the North region co-infection with HBV genotype F and D virus is strongly associated with poor outcome of the disease. In this study, we were unable to establish a connection with the particular genotype evolution of the infection and determine the presence of mutants related to therapeutic response and immune escape. Regarding HCV, the subtyping of isolates was performed by sequencing the NS5B region and 5UTR (n=230). The sub-genotypes more frequent were 1a (45.6%), 1b (46.9%), 3a (6.5%) and 2a / b (0.8%). The Core and E1 regions were also sequenced and in the future could be used to evaluate possible mutations. This study shows that the implementation of protocols for sequencing, bioinformatics and phylogenetic are essential for understanding the molecular epidemiology of hepatitis.*

**Key words:** Hepatitis; Hepatitis B; Hepatitis C; Genotypes; Phylogeny.