

## DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA HUMANA E EXPERIMENTAL

### AVALIAÇÃO DA IMUNIZAÇÃO DE HAMSTERS COM PLASMÍDEOS QUE CODIFICAM COMPONENTES SALIVARES DE *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* (LJM19) E/OU ANTÍGENO PARASITÁRIO (KMP11) CONTRA A INFECÇÃO COM *LEISHMANIA CHAGASI*

#### PLASMIDS ENCODING FOR *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* SALIVARY COMPOUNDS AND KINETOPLASTID MEMBRANE PROTEIN 11 PARTIALLY PROTECTS HAMSTERS AGAINST *LEISHMANIA CHAGASI* INFECTION

Robson Amaro Augusto da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA  
C-elo: robson.amaro@gmail.com.br

Hamsters têm sido utilizados como modelos experimentais visando compreender os mecanismos de respostas imunes contra espécies de *Leishmania* do complexo donovani. Estes modelos são capazes de reproduzir muitas das manifestações clínicas da leishmaniose visceral humana. Estudos recentes demonstraram que a imunização de hamsters com plasmídeos codificantes para proteínas salivares (LJM19) de *Lutzomyia longipalpis*, vetor de *Leishmania chagasi*, bem como antígenos parasitários (KMP11) protege hamsters contra um desafio letal com *L. chagasi*. Neste trabalho, hamsters foram utilizados para avaliar o efeito protetor contra uma infecção por *L. chagasi* utilizando imunização com os plasmídeos que codificam as proteínas LJM19 e KMP11 administrados em conjunto. A imunização com os plasmídeos induziu a produção de IFN- $\gamma$  nos linfonodos drenantes do local das imunizações quando os animais foram avaliados 7, 14 e 21 dias após a última imunização. Uma vez imunizados e desafiados com *L. chagasi* mais saliva do vetor, os animais mostraram maiores relações IFN- $\gamma$ /IL-10 e IFN- $\gamma$ /TGF- $\alpha$  nos linfonodos drenantes quando mensuradas 7 e 14 dias após o desafio. Quando avaliados 2 e 5 meses após o desafio, os animais imunizados mostraram menores cargas parasitárias no baço e no fígado e maiores relações IFN- $\gamma$ /IL-10 e IFN- $\gamma$ /TGF- $\alpha$  no baço 2 meses após o desafio. Além disso, os hamsters imunizados apresentaram maior conservação da arquitetura histológica do baço e do fígado nos tempos avaliados e não desenvolveram distúrbios hematológicos quando comparados com animais controles saudáveis. Contudo, efeito protetor adicional pela imunização com os diferentes plasmídeos administrados em conjunto não foi observado em relação às imunizações com os plasmídeos separados. Comparações entre rotas de administração de plasmídeos foram estudadas utilizando as vias intradérmica e intramuscular. Os grupos de animais que receberam a imunização intradérmica apresentaram uma proteção mais prolongada quando comparados aos animais imunizados intramuscularmente. Estes resultados mostram que apesar da combinação de plasmídeos não induzir maior proteção que os plasmídeos separados, a via de imunização intradérmica pode conferir uma proteção mais duradoura quando comparada com a imunização pela via intramuscular.

Palavras-chave: Hamster. *Leishmania chagasi*. Leishmaniose visceral. Saliva. Plasmídeos de cDNA. Proteção.

Hamsters are able to reproduce many clinical features observed in human visceral leishmaniasis. This model has been largely used aiming to understand the immune responses against *Leishmania donovani* complex species. Recent reports have shown that hamster immunization with plasmids encoding for *L. longipalpis* salivary gland proteins (LJM19) and plasmids encoding for *Leishmania* parasite antigens (KMP11) can protect these animals against a mortal challenge with *Leishmania*. In this study, hamsters were used to evaluate the existence of additional protection by immunization with these two plasmids administrated together. Plasmids induced IFN- $\gamma$  production in draining lymph nodes of immunization site 7, 14 and 21 days after the last immunization. Evaluation of immunized and challenged hamsters with *L. chagasi* plus SGS from vector 7 and 14 days after the challenge showed an enhancement of IFN- $\gamma$ /IL-10 and IFN- $\gamma$ /TGF- $\alpha$  in draining lymph nodes. Two and five months after challenge, immunized animals showed lower parasite loads in liver and spleen and higher IFN- $\gamma$ /IL-10 and IFN- $\gamma$ /TGF- $\alpha$  relations in the spleen two months after challenge. Moreover, immunized hamsters showed higher liver and spleen morphological preservation and did not develop hematological changes five months after the challenge when compared to healthy control animals. Additional protection was not observed in immunization with plasmids administrated together. Comparison between intradermal and intramuscular route of administration of plasmids was evaluated. Intradermally immunized animals showed a longer protection than intramuscular immunized hamsters. These results show that although plasmids injected together do not induce higher protection than plasmids administrated separately, the intradermal route produce a longer protection than intramuscular route of immunization.

Key words: Hamster. *Leishmania chagasi*. Visceral leishmaniasis. Saliva. DNA plasmids. Protection.

## **PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES KAPPA-OPIÓIDES CENTRAIS NO CONTROLE DA GLICEMIA EM RATOS SUBMETIDOS A JEJUM E ESTRESSE DE CONTENÇÃO**

### **PARTICIPATION OF BRAIN KAPPA-OPIOID RECEPTORS IN THE CONTROL OF BLOOD GLUCOSE CONCENTRATION IN FASTED RATS SUBMITTED OR NOT TO RESTRAINT STRESS**

Dina Barros de Souza

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA  
C-elo: dinabarros@ig.com.br

O sistema opiatérgico central participa, assim como outros sistemas neuronais, no controle da glicemia. O presente trabalho foi desenvolvido para investigar a participação do receptor opiatérgico central do tipo kappa na gliorregulação de ratos submetidos a jejum. Foram utilizados ratos Wistar machos (200 a 250g) submetidos a cirurgia de estereotaxia com canulação do terceiro ventrículo cerebral. Um dia antes da sessão experimental, os animais foram submetidos à cateterização da veia jugular externa direita para coletas sanguíneas seriadas nos tempos 0,30,60,90 e 120 minutos. As amostras sanguíneas, após centrifugação, foram utilizadas para dosagem da glicemia e da insulina. Depois da coleta basal (tempo 0), foram administrados por via intracerebroventricular as drogas ICI 199.441 (agonista seletivo dos receptores kappa-opioides) e nor-binaltorfimina (antagonista seletivo dos receptores kappa-opioides). Injeção ICI 199.441 promoveu aumento significativo nos níveis glicêmicos dos ratos submetidos a 18 horas de jejum, quando comparado com as concentrações plasmáticas de glicose de animais controles que receberam salina isotônica. O pré-tratamento com o nor-BNI reverteu o resultado obtido pela administração do agonista kappa-opioides. A administração da nor-binaltorfimina isoladamente não promoveu alterações significativas na glicemia dos ratos. O nor-BNI também não foi capaz de diminuir a hiperglicemia induzida pelo estresse de contenção. As concentrações plasmáticas de insulina dos ratos que receberam ICI 199.441 não sofreram mudanças significativas quando comparado com os níveis plasmáticos de insulina de animais controles. Diante destes resultados, sugere-se que os receptores kappa-opioides centrais ativam mecanismos que levam ao aumento nas concentrações plasmáticas de glicose em animais submetidos a jejum. Além disso, o componente kappa-opioides central parece não ser importante na resposta hiperglicêmica induzida pelo estresse de contenção.

Palavras-chave: Receptores kappa-opioides. Glicemia. Estresse.

---

*The brain opiate system may play a fundamental role in the control of glucose homeostasis. In the present paper, we investigated the role of brain kappa-opioid receptors in the control of blood glucose levels in fasted rats. Wistar male rats (200-250 g) underwent stereotaxic cannulation of the third ventricle. To allow blood sampling, the animals had a jugular catheter implanted the day before the experimental sessions. Plasma samples were collected for measurement of glucose and insulin concentrations. Opioid drugs (ICI 199.441) selective kappa-opioid agonist and nor-binaltorphimine, specific kappa-opioid antagonist) were injected into the third ventricle. The central administration of ICI 199.441 induced a significant increase in plasma glucose levels in rats submitted to fast for 18 hours, as compared to a drug-free control group. Pretreatment with nor-binaltorphimine reverted the hyperglycemic effect observed after the kappa-opioid agonist administration, while the central injection of the kappa-opioid antagonist alone was unable to change the hyperglycemic response to restraint stress. Furthermore, plasma insulin levels were not modified by the central injections of ICI 199.441. It is suggested that central kappa-opioid receptors activate mechanisms triggering the increase in blood glucose levels in fasted rats, and that the hyperglycemic response to restraint stress in these animals seems to rely on mechanisms that are not related to central kappa-opioid components.*

*Key words: Kappa-opioid receptors. Glucose. Stress.*

## **ISOTIPOS DE ANTICORPOS ANTI-LEISHMANIA NO SORO E EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO BAÇO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIA (INFANTUM) CHAGASI**

### **ANTI-LEISHMANIA ISOTYPES ANTIBODIES IN THE SERUM AND CYTOKINES EXPRESSION IN THE SPLEEN OF DOGS NATURALLY INFECTED WITH LEISHMANIA (INFANTUM) CHAGASI**

Juliana Coelho Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA  
C-elo: juli.coelho@uol.com.br

Neste estudo foi analisada a distribuição de isotipos de imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgE envolvidas na resposta a *Leishmania* no soro e a expressão de mRNA para IFN- $\gamma$  e IL-4 *in situ* no baço de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* com diferentes perfis de susceptibilidade ou resistência à doença. A atividade sérica de anticorpos do isotipo IgG1 contra *Leishmania* tendeu a ser maior nos animais com teste cutâneo da Leishmanina negativo e com parasitismo esplênico (grupo *infectado potencialmente susceptível*,  $0,424 \pm 0,401$ ) que nos outros grupos: com teste cutâneo da Leishmanina positivo e ausência de parasitismo esplênico (grupo *infectado potencialmente resistente*,  $0,226 \pm 0,114$ ), ou com ambos teste cutâneo da Leishmanina e cultura esplênica positivos (grupo *em fase indeterminada da doença*,  $0,234 \pm 0,125$ ) ou com ambos os parâmetros negativos (grupo *potencialmente não infectado*,  $0,159 \pm 0,044$ ). Essa diferença não foi, contudo estatisticamente significativa (ANOVA,  $p=0,1450$ ). IgG2 específica anti-*Leishmania* foi maior (ANOVA  $p=0,0001$ ) no grupo *infectado potencialmente susceptível* ( $1,324 \pm 0,322$ ) que nos demais grupos: *em fase indeterminada da doença* ( $0,930 \pm 0,383$ ,  $p=0,05$ ), infectado potencialmente resistente ( $0,916 \pm 0,401$ ,  $p=0,05$ ) e potencialmente não-infectado (média  $0,299 \pm 0,151$ ,  $p=0,001$ ). Foi também maior nos grupos *infectado potencialmente resistente e com infecção em fase indeterminada* que no grupo de animais *potencialmente não infectado*. Não houve diferenças entre os grupos (ANOVA  $p=0,4$ ) nos resultados séricos de IgE anti-*Leishmania*; o grupo potencialmente susceptível ( $0,749 \pm 0,485$ ) tendeu a apresentar valores médios mais elevados que os grupos *potencialmente resistente* ( $0,518 \pm 0,161$ ), ou com doença *em fase indeterminada* (média  $0,591 \pm 0,331$ ) ou *potencialmente não infectados* ( $0,530 \pm 0,121$ ), essas diferenças foram intensificadas pela alta atividade de anticorpos do isotipo IgE anti-*Leishmania* em um dentre os 11 animais examinados, não sendo estatisticamente significativa (ANOVA,  $p=0,4668$ ). Não foram observadas diferenças na expressão de mRNA para IFN- $\gamma$  e IL-4 no baço de animais não infectados ou naturalmente infectados com *L. chagasi* com (a) teste cutâneo da Leishmanina positivo e cultura esplênica negativa ou com (b) teste cutâneo da Leishmanina negativo e parasitismo esplênico. Observou-se uma preponderância de anticorpos da subclasse IgG2 em animais com parasitismo esplênico independente da resposta ao teste cutâneo da Leishmanina. Tais resultados sugerem que a polarização da resposta imune a *Leishmania* pode variar em diferentes compartimentos como sangue e baço.

**Palavras-chave:** Leishmaniose visceral canina. Regulação imune. *Leishmania chagasi*.

*We analyzed the distribution immunoglobulin isotypes IgG1, IgG2 and IgE involved in the response to Leishmania and the mRNA expression for IFN- $\gamma$  and IL-4 in situ in the spleen of dogs naturally infected with IgG1 antibody anti-Leishmania serum activity was higher in animals with negative Leishmanin skin test and splenic parasitism (infected and potentially susceptible to VL group,  $0,424 \pm 0,401$ ) than in other groups: positive Leishmanin skin test and negative splenic parasitism (infected and potentially resistant to VL group,  $0,226 \pm 0,114$ ), or both positive Leishmanin skin test and splenic parasitism (infected with undefined susceptibility status group,  $0,234 \pm 0,125$ ) or both negative parameters (non-infected group,  $0,159 \pm 0,044$ ). This difference however was not statistically significant (ANOVA,  $p=0,145$ ). Specific IgG2 anti-Leishmania was higher (ANOVA  $p=0,0001$ ) in infected and potentially susceptible to VL group ( $1,324 \pm 0,322$ ) than in the other groups: infected with undefined susceptibility status ( $0,930 \pm 0,383$ ,  $p=0,05$ ), infected and potentially resistant to VL ( $0,916 \pm 0,401$ ,  $p=0,05$ ) and non infected group ( $0,299 \pm 0,151$ ,  $p=0,001$ ). Was also higher in infected and potentially resistant to VL and infected with undefined susceptibility status groups than in group of non-infected animals. There was no significant differences (ANOVA  $p=0,4$ ) between different groups in seric IgE anti-Leishmania, infected and potentially susceptible to VL group ( $0,749 \pm 0,485$ ) showed media higher than in infected and potentially resistant to VL group ( $0,518 \pm 0,161$ ), or in infected with undefined susceptibility status group ( $0,591 \pm 0,331$ ) or non-infected group ( $0,530 \pm 0,121$ ), these differences were intensified for the higher IgE antibody activity in one between 11 examined animals, although this was not statistically significant (ANOVA,  $p=0,4668$ ). There was no difference in IL-4 or IFN- $\gamma$  mRNA expression in the spleen among groups of animals non-infected or naturally infected with *L. chagasi*, with (a) strong LST and negative spleen culture for the parasite or with (b) negative LST and parasite in the spleen We could observe an interesting preponderance of antibodies from the IgG2 class in animals with splenic parasitism independently of the LST response. Our results suggest that the polarity of immune response to Leishmania may vary in different compartments such as blood and spleen.*

**Key words:** Visceral canine leishmaniasis. Immune regulation. *Leishmania chagasi*.

## LINFOMA B DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS COM DIFERENCIAÇÃO PLASMOBLÁSTICA: ASPECTOS CLÍNICOS, CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, MORFOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

### PLASMABLASTIC DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA: CLINICAL, MORFOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY FEATURES

Carlos Alberto dos Santos Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA  
C-elo: carlosalberto.med@bol.com.br

Os linfomas B difusos de grandes células plasmoblásticas (LBDGC-LP) constituem um grupo heterogêneo de doenças com curso clínico agressivo, descritos inicialmente em pacientes HIV+. O LP tem sido associado à infecção pelo Herpes vírus tipo 8 em pacientes HIV+ e esses linfomas têm sido observados em pacientes HIV (-). Várias

entidades tais como plasmocitoma anaplásico (PA) e pouco diferenciado (PPD) exibem uma superposição morfológica e imuno-histoquímica com os LP, principalmente quando estão em localização extra-óssea. O objetivo deste trabalho é contribuir para o diagnóstico diferencial das neoplasias linfóides com diferenciação plasmocitóide. Metodologia: foram revisados 154 casos de diagnosticados como Plasmocitomas, LBDGC, LBDGC-PL e Linfomas de pequenas células com diferenciação plasmocitóide (LPC-P) dos arquivos de um centro de referência em oncologia. Foram selecionados 34 casos com padrão plasmocitóide/plasmoblástico, confirmados por imunoistoquímica. Foram utilizados os seguintes marcadores: CD20, VS38c, CD56, CD79a, Mib, Lana-1 (HHV-8), Kappa e Lambda. Os casos foram analisados e classificados em quatro grupos morfológicos: Plasmocitomas bem diferenciados (PBD); PPD; PA/LP; LPC-P. Resultados: Os PBD tinham localização óssea predominante e em 2/3 deste havia Mieloma associado, enquanto os LP tiveram apresentação nodal e visceral em 82% dos casos. A positividade para CD56 ocorreu predominantemente nos PBD ( $p=0,04$ ). Em um caso de LP/PA houve CD56 forte. A sobrevida foi significativamente menos nos casos de LP/PA. Nenhum dos casos mostrou positividade para LNA-1 (HHV-8). A associação com HIV foi observada em um caso de LP. Conclusão: A forte expressão de CD56 nos plasmocitomas sugere que este seja útil no diagnóstico diferencial. A sobrevida foi significativamente menos nos LP. A expressão de Lana-1 (HHV-8) foi negativa em todos os casos de Linfomas e Plasmocitomas, refutando a hipótese de que alguns Linfomas Plasmoblásticos representem a variante sólida do Linfoma de Efusão Primário na nossa série. Palavras-chave: Linfoma Difuso de Grandes Células. Plasmocitoma. HHV-8.

*Plasmablastic lymphoma (PL) is a heterogeneous group of diseases with a aggressive course, first descript in HIV patients. These lymphomas have benn associated with Herpes Virus 8 (HHV-8) in patients HIV positive and cases of PL was descript in HIV nagetive patients. Several entities such a Anaplastic Plasmacytomas (AP) show morphologic features like it, mainly when located in extramedullary sites. Materials and Methods: Our objective is added contribution to clarify the differential diagnostic betwenn these entities. We reviewed 154 cases named as Plasmacytoma, Diffuse Large B-cell Lymphoma, Plasmablastic Lymphoma and Linfoplasmacytic Lymphoma of an cancer reference center. We selected 34 cases with plasmablastic or plasmacytic features with monoclonality for lambda or kappa and VS38c positive. Then we repetead CD20 and classified in: well differentiated plasmacytoma (PBD), poorly differentiated plasmacytoma (PPD), LP/AP a small cells lymphomas with plasmacytic features (LPP-C). Results: The PBD has bone location and was associated with Mieloma in 2/3 pf patients, while PL has nodal or visceral location in 82% of patients. The positively for CD56 was accepted in Plasmacytomas ( $p=0,04$ ). One patient wiht PL/PA showed reactivity for CD56. No patient reacts with Lana (HHV-8). Conclusions: CD56 was a good marker for well differentiated plasmacytoma (BPD) and can be useful in differential diagnostic. The PL survival was shorter than other diseases studied. All patients tested by Lana was negative, oppose the conjecture that some Plasmablastic Lymphomas in our series maybe represents solid variant of Primary Effusion Lymphoma. Key words: Diffuse large B-cell lymphoma. Plasmacytoma. HHV-8.*

## APLICAÇÃO DOS MODELOS EXPERIMENTAIS DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS E RATOS NO ESTUDO DA INTERAÇÃO LEPTOSPIRA-HOSPEDEIRO

### APPLICATION OF EXPERIMENTAL MODELS OF RATS AND TRANSGENIC MICE ON THE STUDY OF HOST-LEPTOSPIRES INTERACTION

Daniel Abensur Athanazio

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA  
C-elo: dathanazio@bahia.fiocruz.br

A leptospirose é uma zoonose de importância global. Em nosso meio, a doença associa-se às condições de saneamento precário e pobreza. Sua patogenia permanece pouco compreendida sendo ainda necessário o desenvolvimento de modelos experimentais que esclareçam os mecanismos de disseminação e colonização da leptospira nos tecidos do hospedeiro, bem como a avaliação de determinantes da susceptibilidade e resistência do hospedeiro à doença. Diversos modelos experimentais já foram utilizados no estudo da leptospirose e, especificamente, dois deles foram pouco explorados, incluindo o modelo do rato (*Rattus norvegicus*), principal hospedeiro de leptospiros patogênicas e protótipo de resistência à doença aguda letal, e o modelo murino, que oferece a vantagem de amplas possibilidades para estudos genéticos e imunológicos. Material e Métodos: Foi estabelecido o modelo de colonização, avaliação das lesões associadas a este processo e tempo de persistência das leptospiros nos rins. O modelo de ratos foi utilizado para o estudo da cinética de disseminação de leptospiros do primeiro até o nono dia da infecção experimental. Além disso, foram realizados estudos comparativos das lesões renais observadas em ratos de laboratório com aquelas presentes em ratos da mesma espécie capturados em Salvador, com e sem evidência microbiológica de infecção. Foi avaliado ainda o papel de citocinas através da infecção experimental de camundongos selvagens e com deficiências

genéticas específicas. Os animais transgênicos usados foram da linhagem C57BL6, deficientes para os genes do receptor Rp55 do fator de necrose tumoral alfa (TNFRKO) ou do interferon gama (IFNKO), e BALB/c deficientes para o gene da interleucina 4. Resultados e Conclusões: Os resultados comprovam a reprodutibilidade da infecção renal persistente e resistência de ratos à doença aguda letal. A disseminação é ampla nos tecidos até o quinto dia da infecção sendo seguida por persistência seletiva nos rins, semelhante ao que é descrito em outros modelos de animais susceptíveis à leptospirose. Uma nefrite intersticial discreta é o único achado que pode ser atribuível à infecção por leptospirosas, visto que é a única reprodutível experimentalmente. A deficiência específica dos genes estudados tem pouco efeito sobre o curso da infecção experimental em camundongos. A maior gravidade da nefrite intersticial nos animais C57BL6 TNFRKO sugere que esta é uma lesão residual provavelmente secundária ao menor controle da disseminação precoce de leptospirosas na ausência desta via da imunidade inata. A linhagem C57BL6 apresenta alterações inflamatórias renais com maior frequência do que a BALB/c. Isto indica que camundongos C57BL6 devem ser priorizados em estudos genéticos na leptospirose experimental por permitir um segundo desfecho a ser avaliado, além da sobrevida.

Palavras-chave: Leptospirose. *Rattus norvegicus*. Camundongos transgênicos. Modelo de animal experimental. Patogênese.

*Leptospirosis is a widespread zoonosis of global importance. It is associated with poor sanitation and poverty in our environment. The pathogenesis of leptospirosis is poorly understood and recent interest emerged on models that may allow studies on dissemination, colonization and determinants of susceptibility to disease. Many animal models have been applied to the study of leptospirosis and two poorly explored models have been rats (*Rattus norvegicus*), the most important reservoir in urban settings and the prototype of resistant host, and the murine model that has the advantage a broad availability of genetic and immunologic tools for basic studies. Methods: A model of persistent colonization was established in rats evaluating related subclinical lesions and persistence of renal infection. This model was applied for the original investigation of early dissemination of leptospires in a resistant host from the first to the ninth day after experimental infection. We also compared renal lesions of chronically infected laboratory rats, sacrificed after a period of one month or later, with captured urban *Rattus norvegicus* stratified by the presence or absence of active renal infection. The role of important cytokine from different immunity branches was investigated by the experimental infection of wild-type and knockout mice. The transgenic animals used in this study were: tumoral necrosis factor receptor Rp55 knockout (TNFRKO) or gamma interferon knockout (IFNKO) C57BL6 mice, and interleukin 4 knockout mice. Results and Conclusions: The results confirmed the marked resistance of rats to acute lethal disease and the reproducibility of renal persistent infection in this model. The wide distribution of leptospirosis occurs until the fifth day followed by selective persistence in renal tubular lumens. These features are in accordance with previous observation in susceptible hosts. A mild picture of interstitial nephritis is the unique feature that can be attributable to leptospiral infection since it is the only lesion that can be reproduce under experimental conditions. The deficiency of the studied genes had a small impact in the course of experimental infection. The most severe inflammatory lesions in TNFRKO C57BL6 mice suggests residual features secondary to a poorer control of early dissemination in those animals with impaired innate responses. The C57BL6 mouse strain exhibits renal inflammatory changes and this suggests that it should be encouraged as the strain of choice for genetic studies of leptospirosis in transgenic mice since it offers a additional endpoint rather than survival.*

*Key words: Leptospirosis. *Rattus norvegicus*. Knockout. Mice. Animal disease models. Pathogenesis.*

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS COLAGÊNICAS ANIÔNICAS, RETICULADAS OU NÃO EM GLUTARALDEÍDO, NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS CRÍTICOS, EM CALVÁRIA DE RATO**

### **ASSESSMENT OF THE OSTEOGENIC POTENTIAL OF THREE-DIMENSIONAL ANIONIC COLLAGEN MATRICES RETICULATED WITH GLUTARALDEID AND NON-RETICULATED IN CRITICAL DEFECTS IN RAT CALVARIA**

Fúlvio Borges Miguel

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA  
C-elo: fulviomiguel@aluno.bahia.fiocruz.br

O objetivo deste trabalho foi avaliar histomorfometricamente, por microscopia de luz comum, o potencial osteogênico de matrizes colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, implantadas em defeitos ósseos críticos, em calvária de ratos. Foram utilizados 76 ratos divididos aleatoriamente para compor quatro grupos: GI – matriz

colagênica aniônica com 24h de hidrólise e 15min de reticulação em GA 0,05% (MCAHGA); GII – matriz colagênica aniônica com 24h de hidrólise (MCA); GIII – matriz colagênica neutra, controle positivo (MCN) e GIV – defeito ósseo vazio, sem implantação de biomaterial, preenchido por coágulo sanguíneo, controle negativo. Os animais foram avaliados nos pontos biológicos de 15, 45, 90 e 120 dias. Os resultados evidenciaram que os biomateriais implantados nos grupos I e II foram biocompatíveis, embora tenham desencadeado inflamação crônica granulomatosa discreta e regressiva. Estas matrizes apresentaram velocidade de biodegradação compatível com a neoformação óssea, a qual se mostrou associada a angiogênese no interior das matrizes, em todos os pontos biológicos. No GIII, a fragmentação e biodegradação mostraram-se acentuadas, pela ausência de tratamento químico do colágeno. A neomineralização evidenciada nos grupos I e II apresentou aumento estatisticamente significativo ao longo dos tempos. O percentual de mineralização do GII (87%) foi estatisticamente diferente daquele encontrado no GI (66%). Ao compararmos estes percentuais com a mineralização observada no GIV, notam-se diferenças muito significantes. Neste último, assim como no GIII, a neoformação óssea esteve limitada às bordas do defeito com fibrose na área seccional do defeito. Conclui-se que as matrizes colagênicas aniônicas apresentaram potencial osteogênico mais evidente nas matrizes sem reticulação em glutaraldeído. Estas matrizes apresentam grande potencial de aplicabilidade clínica, nas terapias regenerativas ósseas.

**Palavras-chave:** Bioengenharia. Regeneração óssea. Colágeno. Glutaraldeído. Rato.

*The aim of this study was to make a histomorphometric evaluation by common light microscopy, of the osteogenic potential of anionic collagen matrices, either reticulated in glutaraldehyde or not, implanted in critical bone defects in rat calvarias. In this study 76 rats were used, randomly divided into four groups: GI – anionic collagenous matrix with 24h of hydrolysis and 5 min of reticulation in GA 0.05% (MCAHGA); GII – anionic collagenous matrix with 24h of hydrolysis (MCA); GIII – neutral collagenous matrix, positive control (MCN) and GIV – empty bone defect, without biomaterial implantation, filled with blood coagulum, negative control. The animals were evaluated at the biological points of 15, 45, 90 and 120 days. The results evidenced that the biomaterials implanted in groups I and II were biocompatible, although they had set of chronic, discrete and regressive granulomatous inflammation. These matrices presented a speed of biodegradation compatible with bone neoformation, which was shown to be associated with angiogenesis inside the matrices at all the biological points. In G III, fragmentation and biodegradation were shown to be accentuated by the absence of chemical treatment of the collagen. The neomineralization evidenced in Groups I and II presented statistically significant increase throughout the times. The percentage of mineralization of GII (87%) differed statistically from that found in GI (66%). When these percentages were compared with the mineralization observed in GIV, very significant differences were noted. In the latter, as in GIII, bone neoformation was limited to the edges of the defect with fibrosis in the sectional area of the defect. It was concluded that the anionic collagen matrices presented more evident osteogenic potential in the matrices without reticulation in glutaraldehyde. These matrices presented a great potential for clinical application in bone regenerative therapies.*

**Key words:** Bioengineering. Bone regeneration. Collagen. Glutaraldehyde. Rat.

## **IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DAS PROTEÍNAS SALIVARES DOS FLEBÓTOMOS *PHLEBOTOMUS ARIASI*, *PHLEBOTOMUS ARGENTIPES*, *PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS* E *PHLEBOTOMUS PAPATASI***

## **IDENTIFICATION AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE SALIVARY PROTEINS FROM *PHLEBOTOMUS ARIASI*, *PHLEBOTOMUS ARGENTIPES*, *PHLEBOTOMUS PERNICIOSUS* AND *PHLEBOTOMUS PAPATASI* AND FLIES**

Luiz Fabiano Borges Oliveira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA

C-elo: lfabiano@bahia.fiocruz.br

A *Leishmania* é transmitida através da picada do flebótomo infectado. O flebótomo injeta o parasita junto com os componentes biologicamente ativos da saliva na pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Camundongos imunizados com extrato de glândula salivar (EGS) ou pré-expostos a picadas de flebótomos não-infectados são capazes de montar uma resposta imune anti-saliva que os protege contra a infecção pela *Leishmania major*. A imunização com as proteínas salivares PpSP15 e Maxadilan também protegeram os camundongos do desafio com *Leishmania major*. No presente trabalho, nós expandimos o atual repertório de proteínas salivares

conhecidas adicionando as seqüências das proteínas salivares dos flebótomos *P. ariasi*, *P. argentipes* e *P. perniciosus* ao domínio público. Ortólogos destas proteínas salivares foram documentados pela análise de árvores filogenéticas permitindo a identificação de proteínas gêneros específicas, espécie-específicas e mais importante, famílias de proteínas comuns entre estes diferentes flebótomos. Baseado nesta análise, especulamos que vacinas baseadas em uma única proteína do vetor não funcionariam através dos gêneros (*Phlebotomus* vs. *Lutzomyia*), mas seriam efetivas dentro do mesmo gênero (*Phlebotomus*) independente da localização geográfica. Adicionalmente, usando imunizações com plasmídeos que codificam para proteínas salivares de *P. ariasi*, caracterizamos as respostas imune humoral e celular, específica contra às proteínas salivares. Usando esta mesma metodologia caracterizamos as proteínas salivares de *P. papatasi* que induzem uma resposta de hipersensibilidade tardia contra o EGS. Observamos que uma proteína da saliva que induz uma reação de hipersensibilidade tardia foi capaz de proteger (PpSP15) enquanto outra exacerbou a infecção (PpSP44) pela *L. major*. Estes dados sugerem que o tipo de resposta imune induzido pelas proteínas salivares podem modular a imunidade contra a *Leishmania*. Adicionalmente observamos que a resposta imune anti-saliva pode ser eficientemente induzida pela quantidade de proteínas salivares injectadas pelos flebótomos durante a picada, mimetizando a forma de transmissão natural.

Palavras-chave: flebótomos, proteínas salivares, resposta imunológica, vacina.

*Leishmania parasites are transmitted by the bite of sand flies. The sand fly injects the parasites together with biologically active salivary components into the host skin during blood feeding. Mice immunized with salivary gland homogenate (SGH) or pre-exposed to uninfected bites were protected against Leishmania major infection. Immunization with the sand fly salivary proteins PpSP15 and Maxadilan also protected mice from L. major infection. Here, we expand the current knowledge on the repertoire of salivary proteins adding the sequences of the salivary proteins of P. ariasi, P. perniciosus and P. argentipes to the public domain. Orthologues of these salivary proteins were documented by phylogenetic analysis allowing us to identify genus-specific proteins, species-specific proteins and, more importantly, protein families common among these different sand flies. We observed that a vaccine based in a unique vector protein most likely would not work across genus (Phlebotomus vs Lutzomyia) but very likely work in the same genus (Phlebotomus) disregarding to geographic localization. Moreover, using DNA immunization coding to the salivary proteins of P. ariasi we investigated the cellular and humoral specific immune responses directed to the SGH. Using the same methodology we were able to identify the salivary proteins within the saliva of the sand fly P. papatasi that induced a delay-type immune response. We found that one salivary protein protected (PpSP15) while another exacerbated (PpSP44) L. major infection, suggesting that the type of immune response induced by specific salivary proteins can prime and direct anti-Leishmania immunity. Additionally, we were able to detect a specific recall response in the vaccinated animals after bites of uninfected sand flies. This work validates the powerful protection that can be acquired through vaccination with the appropriate salivary molecule and more importantly, shows that this protective immune response is efficiently recalled by sand fly bites, the natural route of transmission.*

Key words: *Phlebotomus*, salivary proteins, immunological, vaccine.

## ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)

## EVALUATION OF THE IMMUNE RESPONSE DURING HEPATITIS VIRUS C (HCV) INFECTION

Maria Alice Sant'Anna Zarife

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA  
C-elo: mzarife@bahia.fiocruz.br

Os mecanismos da resposta imune que ocorrem nos estágios iniciais da infecção pelo VHC em humanos ainda não estão totalmente esclarecidos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a resposta imune em doadores de sangue soropositivos para o VHC (VHC<sup>+</sup>) separados em grupos de não virêmicos (VHC<sup>+/-</sup>) e virêmicos (VHC<sup>+/+</sup>) e comparar os resultados com aqueles observados no grupo controle de não-infectados (NI). As citocinas foram dosadas no soro pelo Kit CBA (cytometric bead array; BD) e os marcadores de superfície celular foram determinados nas células mononucleares do sangue periférico por análise de citometria de fluxo. Foram observadas freqüências aumentadas de altos produtores de IL-1 $\beta$  e IL-8 no grupo VHC<sup>+/-</sup>, enquanto um aumento nas freqüências de altos produtores de IL-6, IL-10 e IL-12 foi observado no grupo VHC<sup>+/+</sup>. Destaca-se um aumento seletivo na freqüência de altos produtores de IL-1 $\beta$  no grupo VHC<sup>+/-</sup> com teste confirmatório para o anti-VHC (RIBA) indeterminado, enquanto um aumento na freqüência de altos produtores para IL-8 foi restrito ao grupo VHC<sup>+/-</sup> com RIBA positivo, que também apresentou além do aumento na freqüência de altos produtores para a IL-4, freqüências aumentadas de altos produtores de IL-6,

IL-10 e IL-12, como no grupo VHC<sup>+/+</sup>. Adicionalmente, foram observados níveis aumentados de IL-6, IL-10 e IL-12 particularmente no grupo VHC<sup>+/+</sup> com carga viral baixa. Um achado muito importante foi o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-8 e TNF- $\alpha$  no grupo VHC<sup>+/+</sup> com valores normais de alanina-aminotransferases (ALT), enquanto níveis aumentados de IL-2 e IFN- $\gamma$  foram observados no grupo VHC<sup>+/+</sup> com valores elevados de ALT. Foi observado ainda que, apesar de não haver modificações no perfil hematológico nos dois grupos estudados, níveis aumentados de células pré-NK (CD3<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup>) e diminuição das células NK maduras (CD3<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) foram características da imunidade inata no grupo VHC<sup>+/+</sup>. Apesar de ambos os grupos VHC<sup>+</sup> apresentarem altos percentuais de células NK CD56<sup>Bright</sup>, esta população foi particularmente mais elevada no grupo VHC<sup>+/+</sup> com carga viral baixa. Um aumento da frequência de células NKT2 foi também particularmente observado neste mesmo grupo. Um aumento da frequência de células T CD4<sup>+</sup> ativadas (CD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>) foi uma característica distinta do grupo VHC<sup>+/+</sup>, enquanto o aumento do percentual de células B (CD19<sup>+</sup>) e de células CD19<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> foram as principais características do grupo VHC<sup>+/+</sup>, particularmente naqueles apresentando carga viral baixa. Apesar das células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>High</sup> estarem elevadas em ambos os grupo VHC<sup>+</sup>, o aumento desta subpopulação de células T regulatórias (Treg) foi predominantemente observado no grupo VHC<sup>+/+</sup> que apresentava baixa carga viral. Um aumento paralelo das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> com células pré-NK e células T CD4<sup>+</sup> ativadas foi observado no grupo VHC<sup>+/+</sup>, enquanto um aumento paralelo das células Treg e células B, característica do grupo VHC<sup>+/+</sup>, foi seletivamente encontrado naqueles com carga viral baixa. Finalmente, o resultado do presente trabalho sugere que as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ /IL-8/ TNF- $\alpha$ ) relacionadas principalmente com a resposta imune inata, estão associadas com eventos protetores, enquanto as citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , associadas com o perfil de imunidade adaptativa citotóxica, devem estar mais ligadas com o aumento de ALT, biomarcador de lesão hepática. Adicionalmente, os dados do presente trabalho indicam que as células NK CD56<sup>Bright</sup>, juntamente com as células pré-NK e células TCD4<sup>+</sup> ativadas em paralelo com as células T regulatórias podem ter um papel importante no controle da viremia na infecção pelo VHC. Além disso, enquanto a baixa carga viral do VHC parece estar associada com o aumento de células NK CD56<sup>Bright</sup> e resposta de células B em paralelo com as células T regulatórias.

Palavras-chave: VHC. Doadores de sangue. Citocinas. Níveis de ALT. Células NK e NKT. Células T ativadas. Células B. Células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>.

*The complete mechanism underlying the immunological events in early stages of HCV infection in humans is poorly understood. The aim of this work was to characterize the immune response in HCV seropositive (HCV<sup>+</sup>) blood donors, including non-viremic-HCV<sup>+/+</sup> and viremic-HCV<sup>+/+</sup>, in comparison with HCV-seronegative-NI blood donors. Cytokine levels were measured in serum by the cytometric bead array test (BD) and cell surface markers of mononuclear cells from peripheral blood were determined by Flow Cytometric Analysis. Our findings demonstrated enhanced frequency of IL-1 $\beta$  and IL-8 high-producers within HCV<sup>+/+</sup> whereas enhanced frequency of IL-6, IL-10 and IL-12 high-producers was observed within HCV<sup>+/+</sup>. Interestingly, increased frequency of IL-1 $\beta$  high-producers was selectively observed among HCV<sup>+/+</sup> with indeterminate anti-HCV confirmatory test-(RIBA) while enhanced frequency IL-8 high-producers was restricted to the HCV<sup>+/+</sup> subgroup displaying positive RIBA, which also showed besides increased frequency of IL-4 high-producers, enhanced frequency of IL-6, IL-10 and IL-12 higher-producers, likely the HCV<sup>+/+</sup> group. Additionally, we have also observed increased levels of IL-6, IL-10 and IL-12 particularly in HCV<sup>+/+</sup> with low HCV-viral load. The most outstanding finding was the increased levels of IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$  observed in HCV<sup>+/+</sup> displaying normal ranges of alanine-aminotransferase-ALT whereas IL-2 and IFN- $\gamma$  were selectively increased in HCV<sup>+/+</sup> with elevated ALT levels. Moreover, our data highlighted that despite no changes in the hematological profiles of both groups, increased levels of pre-NK-cells (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) besides lower frequency of mature NK-cells (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) were the hallmark of the innate immunity in HCV<sup>+/+</sup>. Although both HCV<sup>+</sup> groups displayed high percentages of CD56<sup>Bright</sup> NK-cells, this subset was particularly higher in HCV<sup>+/+</sup> with low HCV-viral load. Increased frequency of circulating NKT2 subset was particularly observed in HCV<sup>+/+</sup> bearing low HCV-viral load. Enhanced frequency of activated CD4<sup>+</sup> T-cells (CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) was a distinctive feature of HCV<sup>+/+</sup>, whereas increased percentage of B-cells (CD19<sup>+</sup>) besides enhanced levels of CD19<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> cells were the major phenotypic features of HCV<sup>+/+</sup>, particularly those displaying low HCV-viral load. Although CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> cells was expanded in both HCV<sup>+</sup> groups, this regulatory T-cell subset (Treg) was predominantly enhanced in HCV<sup>+/+</sup> showing low HCV-viral. Parallel increment of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> cells, pre-NK and activated CD4<sup>+</sup> T-cells was observed in HCV<sup>+/+</sup> whereas the parallel enhancement of Treg and B-cells, hallmarks of HCV<sup>+/+</sup>, was selectively found in low HCV-viral load. Taken together, our results suggested that pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ /IL-8/TNF- $\alpha$ ), mainly related with innate immune response, were more prone to be associated with protective events whereas IL-2 and IFN- $\gamma$  largely involved with the adaptive immunity cytotoxic profile, were more linked with the increment of the liver injury biomarker ALT. Besides, our findings suggested that CD56<sup>Bright</sup> NK-cells together with pre-NK cells and activated CD4<sup>+</sup> T-cells parallel with T-cell regulatory cells may play an important role controlling viremia during HCV infection. Moreover, low HCV-viral load seems to be associated with enhanced CD56<sup>Bright</sup> NK-cells and B-cell responses besides a T-regulated immunological profile.*

*Key words: HCV. Blood donors. Cytokines. ALT levels. NK and NKT cells. Activated T cells. B-cells. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>.*

## ESTABELECIMENTO DE ENSAIOS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE CÃES A *LEISHMANIA CHAGASI*

### ESTABLISHMENT OF AN *IN VITRO* ASSAY TO EVALUATE CANINE IMMUNE RESPONSE TO *LEISHMANIA CHAGASI*

Cleusa Alves Teodoro Rodrigues

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA  
C-elo: crodrigues@bahia.fiocruz.br

A leishmaniose visceral (LV) é apontada como doença re-emergente e sua ascensão se relaciona com a ineficácia dos métodos de controle. Há evidências de que o cão é o principal reservatório da forma zoonótica da LV e que *L. infantum/L. chagasi* seja mantida em comunidades urbanas e peri-urbanas através de um ciclo cão-inseto-cão. Cães com leishmaniose visceral canina (LVC) exibem doença progressiva e geralmente fatal (cão susceptível ou sintomático) ou uma aparente resistência (cão assintomático). Animais doentes apresentam depressão das funções mediadas pelas células T. Em contraste, cães infectados e assintomáticos apresentam resistência ao parasito associada com uma resposta imune celular efetiva. A elucidação dos mecanismos que vão mediar a resposta imune na LVC pode auxiliar o desenvolvimento de vacinas ou estratégias de imunoterapia. O objetivo desta tese foi estabelecer dois ensaios *in vitro*. O primeiro ensaio foi estabelecido para avaliar se a resposta protetora à infecção por *L. infantum/L. chagasi* de cães imunizados e assintomáticos se reproduz num sistema de re-estimulação *in vitro* de PBMC. O segundo ensaio teve como objetivo estabelecer um sistema de estimulação primária *in vitro* (PIV), que consistiu em utilizar co-culturas de PBMC de cães saudáveis, previamente estimulados com promastigotas de *L. infantum/L. chagasi*, e macrófagos autólogos infectados. O primeiro ensaio mostrou que sobrenadantes de PBMC de cães assintomáticos são capazes de estimular macrófagos de cães normais a reduzir a infecção por *L. chagasi*. A detecção de IFN- $\gamma$  no sobrenadante de PBMC desses cães imunizados e re-estimulados *in vitro* com antígeno de *L. infantum/L. chagasi* foi associada à produção de NO pelos macrófagos caninos estimulados com sobrenadantes desses PBMC. O segundo ensaio estabelecido, um sistema de PIV, mostrou que a expressão de IFN- $\gamma$  e IL-4 pelos PBMC estimulados primariamente *in vitro* com *L. infantum/L. chagasi* apresenta uma correlação negativa com a infecção. O aumento da expressão dessas citocinas pelos PBMC estimulados primariamente com *L. infantum/L. chagasi* durante seis dias e co-cultivadas com macrófagos está correlacionado a uma diminuição do percentual de macrófagos infectados. A expressão de IL-10 desses PBMC foi variável e não pôde ser correlacionada à infecção. Esse é o primeiro relato de um sistema de PIV com PBMC e macrófagos caninos infectados por *L. infantum/L. chagasi*. Esse ensaio, utilizando cães não expostos ao parasito, permitiu discriminar *in vitro* a resposta de macrófagos a *L. infantum/L. chagasi*. Os dois ensaios estabelecidos poderão ser utilizados como testes para prever a resposta do cão à infecção ou na avaliação de candidatos vacinais contra a LVC.  
Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina. *Leishmania chagasi*. Macrófagos. Células mononucleares do sangue periférico. Citocinas. Óxido nítrico.

*Visceral leishmaniasis (VL) is considered a re-emerging parasitic disease and its spreading has been associated with the low efficacy of control methods. Dogs constitute the main reservoir of parasite in zoonotic VL and L. infantum/ L. chagasi is transmitted from an infected dog to a non-infected dog by the sandfly bite in domestic and peridomestic cycles. After infection, some dogs present progressive disease (susceptible and symptomatic dogs), whereas others do not develop the disease (asymptomatic dogs). Animals with progressive disease develop an impaired cell-mediated immune response, while asymptomatic dogs can control the parasite. The study of mechanisms underlying protection and susceptibility to disease in canine visceral leishmaniasis (CVL) would be helpful for vaccine development and immunotherapy strategies. The aim of this study was to establish two reliable in vitro assays for the evaluation of canine immune response to L. chagasi. The first assay was established to evaluate the reproductibility of protective response to L. infantum/L. chagasi from immunized and asymptomatic dogs in an in vitro restimulation assay using PBMC. In the second assay, an effort has been made to establish an in vitro priming system (PIV) using L. infantum/ L. chagasi primarily-stimulated PBMC from naïve dogs co-cultivated with autologous infected macrophages. In the first assay, we demonstrated that PBMC supernatant from asymptomatic dogs are able to stimulate macrophages from naïve dogs to kill intracellular L. chagasi. The IFN- $\gamma$  released by PBMC from immunized dogs, after in vitro restimulation with L. infantum/L. chagasi antigen, is associated with NO production by canine macrophages stimulated with supernatant from these PBMC. In the second assay, we showed a negative correlation of the expression of IFN- $\gamma$  and IL-4 by PBMC stimulated with L. chagasi and co-cultivated with autologous infected macrophages with infection. The increase in cytokine expression by L. chagasi primarily stimulated PBMC for 6 days and co-cultivated with macrophages correlated with the reduction in parasite load of macrophages. IL-10 expression by PBMC was variable and does not show any correlation with infection. This is the first report of a PIV system using PBMC and canine macrophages infected with L. infantum/L. chagasi. This assay, using non-exposed dogs, allowed the differentiation of L. infantum/L. chagasi-induced immune responses. The two established assays are a useful tool to predict canine immune response to infection and to identify vaccine antigen candidates for CVL.*

*Key words: Canine visceral leishmaniasis. Leishmania chagasi. Macrophages. Peripheral blood mononuclear cells. Cytokine. Nitric oxide.*

## **AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO EM CRIANÇAS COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

### **ASSESSMENT OF A REAL-TIME PCR ASSAY FOR THE DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN PEDIATRIC PATIENTS**

Isadora Cristina de Siqueira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA  
C-elo: isadora@uefs.br

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo a Leishmaniose visceral (LV) a forma mais grave da doença. A Organização Mundial de Saúde estima a existência de 500.000 casos/ano mundialmente, sendo que a maioria desses casos ocorre em crianças com idade inferior a 10 anos. Atualmente não existem métodos disponíveis para avaliar o prognóstico e a probabilidade de falha terapêutica em pacientes com LV. Conduzimos um estudo prospectivo entre crianças com LV admitidas em um hospital pediátrico, para avaliar o valor do PCR quantitativo para o manejo clínico da LV em pacientes não infectados pelo HIV. Cinquenta e três pacientes com LV foram incluídos no estudo, sendo observado 85% de cura (79,2 % de cura com 30 dias de tratamento e 5,6 % de cura após tratamento prolongado), 9,4% de óbitos e 5,6% de recidivas. No momento do diagnóstico, DNA de *Leishmania* foi detectado em sangue periférico de 44/53 (83%) pacientes e em 26/29 (89,6%) amostras de medula óssea. Após uma semana de tratamento, os níveis de parasitos (carga parasitária em sangue periférico) diminuíram expressivamente (média de  $3.086 \pm 9.365$  parasitos/ml para  $333 \pm 636$  parasitos/ml). As cargas parasitárias tornaram-se indetectáveis após duas semanas de tratamento em todos os pacientes que atingiram critérios de cura com quatro semanas de tratamento. Uma amostra negativa no 14º dia de tratamento foi preditora de cura satisfatória, com as amostras que permaneceram positivas predizendo recaídas ou resposta clínica insatisfatória.  
Palavras-chave: Leishmaniose Visceral. PCR em tempo real. PCR quantitativo.

*Leishmaniasis is caused by protozoa from the genus Leishmania and visceral leishmaniasis (VL) represents the most severe form of the disease. The World Health Organization accounts for an estimated 500,000 cases/year worldwide, most of them among children under 10 years. Currently, there is no method available to assess the prognosis and likelihood of non-response to therapy in VL patients. We conducted a prospective study in children admitted to a pediatric hospital with VL, to assess the value of Leishmania Real-Time PCR for clinical management of VL in non-HIV patients. Fifty three patients with VL were included in the study, with 85% cure (79.2 % cure with 30 days of treatment and 5.6 % cure after prolonged treatment), 9.4% of death and 5.6% of relapses. At the time of diagnosis, Leishmania DNA was found in peripheral blood of 44/53 (83%) patients and, in 26/29 (89.6%) of bone marrow samples. Following one week of treatment, parasites levels (PB DNA load) decreased expressively from the baseline (mean  $3.086 \pm 9365$  parasites/ml to  $333 \pm 636$  parasites/ml). The PB DNA load became negative in the second week of treatment in all patients who achieved satisfactory cure with 4 weeks of treatment. A sample negative with 14 days was a predictor of satisfactory cure with the remaining positive samples predicting relapses or unsatisfactory clinical response to treatment.*

*Key words: Visceral leishmaniasis. Real-Time PCR. Quantitative PCR.*

## **AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE MATRIZES DE QUITOSANA COMO ARCABOUÇO TRIDIMENSIONAL PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

### ***IN VITRO* AND *IN VIVO* EVALUATION OF 3D CHITOSAN MATRIXES AS SCAFFOLD TO BONE REGENERATION**

Rhyna Carla da Cunha Costa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA

C-elo: rccosta@tre-ba.gov.br

Na primeira parte desse estudo, foi avaliada *in vitro* a influência de 2 diferentes graus de N-acetilação (DA) de matrizes tridimensionais (3D) de quitosana sobre a viabilidade, adesão, distribuição e proliferação de células mesenquimais extraídas da medula óssea de ratos (rBMSC's), assim como, a influência do soro autólogo de rato (RS), sobre os mesmos aspectos, como fonte de proteínas e fatores de crescimento. Para tanto, 10 animais foram

utilizados para extração do RS e das rBMSC's. As células foram semeadas e induzidas a osteodiferenciação sobre matrizes 3D de quitosana, com FBS (Soro Fetal Bovino) e sem adição do RS. Na segunda parte dessa análise, foi analisado *in vivo* o comportamento biológico de matrizes 3D de quitosana para a regeneração óssea, com DA's de 4 e 15%, quando implantadas em defeitos com morfologia e dimensões críticas, criados em calvária de rato. Utilizou-se 80 animais, distribuídos em 4 grupos, com 5 animais cada, avaliados nos pontos biológicos de 7, 15, 45 e 120 dias. Os grupos foram divididos em: GI Controle – Sem implantação de biomaterial; GII – Implantação de matriz de quitosana 4%; GIII – Implantação de matriz de quitosana 15%; GIV – Implantação de matriz de colágeno tipo I. Os espécimes foram fixados e incluídos em blocos de resina e cortados em micrótomos de alto impacto, para tecidos não descalcificados e corados em H/E, Picrosírius Red e Tricrômio de Masson Goldner para avaliação histológica em microscopia de Luz. Também, foram confeccionados blocos em parafina para análise imunohistoquímica da formação vascular utilizando-se PECAM-1. Os resultados *in vitro* demonstraram que as rBMSC's apresentaram-se viáveis quando cultivadas nos 2 tipos de soro. Mais ainda, as rBMSC's aderiram e proliferaram sobre as matrizes de quitosana, em especial sobre a de 4%. Em adição, os achados sugeriram que o RS apresenta as proteínas e fatores necessários para o crescimento das rBMSC's. Quando analisado o comportamento biológico das matrizes 3D *in vivo*, concluiu-se que, muito embora, as matrizes tenham sido consideradas biocompatíveis, e que tenham tido a sua região central permeada por vasos sanguíneos, não foi encontrada formação óssea *de novo* nos sítios de implantação. Palavras-chave: Bioengenharia. Quitosana. Regeneração óssea. Rato.

*In the first part of this study, an in vitro evaluation was made of the influence of 2 different grades of N-acetylation (DA) of tridimensional matrixes (3D) of chitosan on the viability, adhesion, distribution and proliferation of mesenchyme cells extracted from the bone marrow of rats (rBMSC's), as well as the influence of autologous rate serum (RS), on the same aspects, as a source of proteins and growth factors. For this purpose, 10 animals were used for the extraction of RS and rBMSC's. The cells were seeded and induced to osteodifferentiate on 3D chitosan matrixes, with FBS (Fetal Bovine Serum) and with the addition of RS. In the second part of this analysis, the biologic behavior of the 3D chitosan matrixes was analyzed in vivo for bone regeneration, with DA's of 4 and 15%, when implanted in defects with critical morphology and dimensions, created in rat calvarias. Eighty animals distributed into 4 groups with 5 animals in each were used, and evaluated at the biological time points of 7, 15, 45 and 120 days. The groups were divided as follows: GI Control – Without biomaterial implantation; GII – Implantation of chitosan matrix at 4%; GIII – Implantation of chitosan matrix at 15%; GIV – Implantation of collagen type I matrix. The specimens were fixed and embedded in blocks of resin, and cut in a high impact microtome for non decalcified tissues, and stained with H/E, Picrosirius Red and Goldner's Masson Trichrome for histomorphometric evaluation under light microscopy. Paraffin blocks were also made for immunohistochemical analysis of the vascular formation, using PECAM-1. The results in vitro demonstrated that the rBMSC's presented as viable when cultivated in the 2 types of serum. Furthermore, the rBMSC's adhered and proliferated on the chitosan matrixes, especially on the one with 4%. In addition, the findings suggest that RS presents the proteins and growth factors necessary for the growth of the rBMSC's. When the biologic behavior of the 3D matrixes were analyzed in vivo, it was concluded that although the matrixes had been considered biocompatible, and also had their central regions permeated by blood vessels, no de novo bone formation was found at the implantation sites.*

*Key words: Bioengineering. Chitosan. Bone regeneration. Rat.*

## **ESTUDO *IN SITU* E *IN VIVO* DA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR *M. FORTUITUM* OU *M. INTRACELLULARE* EM CAMUNDONGOS BALB/C**

### **ESTUDO *IN SITU* E *IN VIVO* DA RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA INDUZIDA POR *M. FORTUITUM* OU *M. INTRACELLULARE* EM CAMUNDONGOS BALB/C**

Tânia Regina Marques da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA

C-elo: tsilva@bahia.fiocruz.br

Micobactérias ambientais estão amplamente distribuídas no meio, podendo ser encontradas em água, solo, poeira, alimentos e animais. Com o aumento do número de casos de micobacterioses ocorrendo simultaneamente com infecções por HIV o estudo de micobactérias ambientais tem assumido importância. As manifestações clínicas das infecções causadas por esses patógenos vão desde abscessos localizados até doenças pulmonares, ou mesmo doenças disseminadas em indivíduos imunocomprometidos. A manifestação da doença, assim como a manutenção da infecção micobacteriana, dependem da interação entre a micobactéria e o sistema imune do hospedeiro. A patogênese da

infecção micobacteriana é associada à formação de granulomas, onde pode ocorrer uma resposta protetora do hospedeiro, concomitante com lesão tecidual. Em estudo anterior demonstramos que em macrófagos da linhagem J774E clone estimulados com IFN- $\gamma$  há uma diminuição da viabilidade intracelular de *M. intracellulare*, num processo dependente de NO, enquanto que não houve diferença na viabilidade intracelular de *M. fortuitum* em células estimuladas. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta imuno-inflamatória *in vivo* em camundongos BALB/c infectados por *M. intracellulare* ou *M. fortuitum*. A carga bacilar no baço e fígado desses camundongos foi determinada pelas unidades formadoras de colônias (UFC) nos tempos de 7, 14, 28 e 60 dias após a infecção por uma ou outra espécie de micobactéria. Foi realizada a caracterização da lesão tecidual presente no fígado dos animais infectados, bem como a expressão de RNAm para citocinas envolvidas na resposta granulomatosa contra micobactérias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10) e iNOS. Essa enzima é importante na eliminação de micobactérias intracelulares, pois induz a produção da molécula microbicida óxido nítrico (NO) pelos macrófagos infectados. Os dados obtidos nesse trabalho mostram que as duas espécies de micobactérias ambientais induzem respostas distintas em camundongos BALB/c. Em todos os tempos avaliados a carga bacilar no baço ou fígados dos animais infectados foi sempre maior no grupo infectado por *M. intracellulare*. Também, nesse grupo, observou-se a presença de numerosos granulomas a partir do 14º dia de infecção, em contraste com o grupo infectado por *M. fortuitum*. A expressão de RNAm para as citocinas IFN- $\gamma$  e IL-10 foi sempre maior no fígado de animais infectados por *M. fortuitum*, comparado com o grupo de animais infectados *M. intracellulare*. Em conclusão, embora camundongos BALB/c controlem a infecção pelas duas espécies de micobactérias, caracterizando um perfil de resistência, a resposta imuno-inflamatória é modulada diferentemente por *M. intracellulare* ou *M. fortuitum*, ao longo da infecção.

Palavras-chave: Micobactérias ambientais. *M. intracellulare*. *M. fortuitum*. Camundongos BALB/c. Granuloma.

*Environmental mycobacteria are found in water, soil, dust, food and animals. Study of ambient mycobacteria it has assumed importance mostly because of the increase of the number of cases of micobacterioses co-occurring with infections for HIV, a time that the infection caused for these patógenos ones goes since the abscesses located until pulmonary and spread illness in imunocomprometidos individuals. Disease manifestations as well as infection outcome depend on interaction between mycobacteria and host immune system. Pathogenesis of the mycobacterial infection is associated with granulomas formation, where a protective reply of the host can occur, concomitant with tecidual injury. The goal of this work was to evaluate the immune-inflammatory response in BALB/c mice infected with *M. intracellulare* or *M. fortuitum*. The bacillary load in spleen and liver of these mice was determined by the UFC in the times of 3, 7, 14, 28 and 60 days after the infection for one or another species of mycobacterium. The characterization of liver injury of infected mice was carried out. In additional, mRNA expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10, cytokines as well as of iNOS, enzyme responsible to the synthesis of the microbicidal molecule, nitric oxide, was determined. Data demonstrate that the two species of environmental mycobacteria induce distinct response in BALB/c mice. The bacillary load in spleen and liver of the *M. intracellulare* infected animals was higher in all the times evaluated in comparison to *M. fortuitum* infected group. Also, in the *M. intracellulare* group, it was observed presence of numerous and larger granulomas from the 14<sup>th</sup> day of infection, in comparison to the group infected by *M. fortuitum*. The mRNA expression of IFN- $\gamma$  and IL-10 was higher in the liver of animals infected by *M. fortuitum*, compared with the group of *M. intracellulare* infected animals. In conclusion, the present study shows that BALB/c mice can control *M. intracellulare* or *M. fortuitum* infection. However, the immune response is differentially modulated by these mycobacterium species.*

Key words: Environmental mycobacteria. *M. intracellulare*. *M. fortuitum*. BALB/c mice. Granuloma.

## **PAPEL DA SALIVA DO *LUTZOMYIA INTERMEDIA* NA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*: DESENVOLVIMENTO DE VACINAS PARA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

## **ROLE OF THE SALIVA OF *LUTZOMYIA INTERMEDIA* IN *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* INFECTION: DEVELOPMENT OF VACCINES FOR CUTANEOUS LEISHMANIASIS**

Tatiana Rodrigues de Moura

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA

C-e-lo: tmoura@bahia.fiocruz.br

A saliva de flebotomíneos tem uma série de componentes farmacológicos e imunomoduladores, e a imunidade à saliva protege contra a infecção por *Leishmania*. Neste trabalho, nós estudamos a resposta imune contra a saliva de *Lutzomyia intermedia*, o principal vetor da *Leishmania braziliensis* no Brasil, e os efeitos da pré-exposição à saliva na infecção por *L. braziliensis*. Nós também avaliamos a resposta imune a distintas proteínas da saliva de *L. intermedia*,

as quais produziram desfechos contrastantes na infecção por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c imunizados com o sonicado de glândula salivar (SGS) de *L. intermedia* desenvolveram anticorpos contra saliva e uma resposta celular com a produção das citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4. O infiltrado inflamatório nos animais imunizados com SGS foi composto por muitas células polimorfonucleares e poucas mononucleares. Camundongos desafiados com *L. braziliensis*, na presença da saliva, não foram protegidos contra a infecção apesar de um desenvolvimento de lesão mais tardio. O sítio de inoculação e o linfonodo regional apresentaram uma contínua replicação parasitária e uma baixa razão de IFN- $\gamma$  por IL-4, indicando que a pré-exposição a saliva de *L. intermedia* modula a resposta imune. A imunização com plasmídeos que codificam distintas proteínas salivares de *L. intermedia* modulou a infecção por *L. braziliensis*. Surpreendentemente, camundongos BALB/c imunizados com LliSP01 e LiSP05 tiveram uma proteção parcial contra a infecção enquanto a imunização com LliSP07 exacerbou a infecção, sugerindo que a imunização com essas distintas moléculas altera o curso da imunidade anti-*Leishmania*. Esses resultados sugerem que a pré-exposição a saliva de flebotômios possui um importante papel no desfecho da leishmaniose cutânea, em ambos camundongos. Esses resultados enfatizam possíveis obstáculos no desenvolvimento de vacinas baseadas na saliva de *L. intermedia* e a necessidade de identificar e selecionar candidatos individuais ao invés da saliva total, a qual pode favorecer uma resposta não protetora.

Palavras-chave: Flebotomos. Saliva. Leishmaniose. Vacina. *L. braziliensis*. *L. intermedia*.

*Sand fly saliva has an array of pharmacological and immunomodulatory components, and immunity to saliva protects against Leishmania infection. In the present study, we have studied the immune response against Lutzomyia intermedia saliva, the main vector of Leishmania braziliensis in Brazil, and the effects of saliva pre-exposure on L. braziliensis infection. We also analyzed the immune response to distinct salivary proteins from L. intermedia that produced contrasting outcomes in L. braziliensis infection. BALB/c mice immunized with L. intermedia salivary gland sonicate (SGS) developed a saliva-specific antibody response and a cellular immune response with presence of both IFN- $\gamma$  and IL-4. The inflammatory infiltrate observed in SGS-immunized mice was comprised of numerous polymorphonuclear and few mononuclear cells. Mice challenged with live L. braziliensis, in the presence of saliva, were not protected although lesion development was delayed. The inoculation site and draining lymph node showed continuous parasite replication and low IFN- $\gamma$  to IL-4 ratio, indicating that pre-exposure to L. intermedia saliva leads to modulation of the immune response. Furthermore, in an endemic area of cutaneous leishmaniasis, patients with active lesions displayed higher levels of anti-L. intermedia saliva antibodies when compared to individuals with a positive skin test result for Leishmania. DNA immunization with distinct recombinant plasmids encoding salivary proteins from L. intermedia led to modulation of L. braziliensis infection. Surprisingly, BALB/c mice immunized with plasmids LliSP01 and LiSP05 showed a partial protection against infection while the immunization with plasmid LliSP07 exacerbated the infection, suggesting that immunization with these distinct molecules alters the course of anti-Leishmania immunity. Interestingly, BALB/c mice immunized with plasmids LliSP01 and LiSP05, by the intramuscular route, showed sterile cure at the site of infection and a significant reduction in parasite load in the draining lymph node. These results show that pre-exposure to sand fly saliva plays an important role in the outcome of cutaneous leishmaniasis, in both mice and humans. Moreover, immunization with three L. intermedia salivary antigens produced immune profiles that correlated with either resistance or susceptibility to L. braziliensis infection. These results emphasize possible hurdles in the development of vaccines based on sand fly saliva and the need to identify and select the individual salivary candidates instead of using whole salivary mixture that may favour a non-protective response.*

Key words: Sand fly. Saliva. Leishmaniasis. Vaccines. *L. braziliensis*. *L. intermedia*.

## **AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE RESPOSTA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE BALB/C INFECTADOS *IN VITRO* COM *LEISHMANIA AMAZONENSIS* OU *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

### **AVALIATION OF THE RESPONSE PROFILES OF THE PERITONEALS MACROPHAGE INFECTED *IN VITRO* WITH *LEISHMANIA AMAZONENSIS* OR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

Marcus Welby Borges Oliveira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA

C-e-lo: welby@bahia.fiocruz.br

Macrófagos (M $\phi$ s) são células do sistema imunológico que desempenham importante papel na defesa contra *Leishmania*. Neste trabalho, foram investigados alguns fatores e mecanismos que podem estar envolvidos na determinação dos perfis de resposta de M $\phi$ s peritoneais de BALB/c infectados *in vitro* com *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*. Observou-

se que IFN- $\gamma$  não foi capaz de reduzir a infecção causada por ambas as espécies de *Leishmania*. A sinergia entre IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  leva a uma diminuição do percentual de infecção dos M $\phi$ s por La e Lb no tempo de 72 h. Tanto o pré-tratamento com IFN- $\gamma$  quanto com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  não alterou a viabilidade de *L. amazonensis* isoladas de M $\phi$ s em relação ao grupo que não sofreu pré-tratamento. No entanto, *L. braziliensis* se mostrou susceptível a ação dessas citocinas, já que o pré-tratamento dos M $\phi$ s com IFN- $\gamma$  foi capaz de diminuir o número de parasitos viáveis isolados. A sinergia entre IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  se mostrou bastante efetiva nesse grupo uma vez que o número de Lb isoladas a partir dos M $\phi$ s infectados mostrou-se bastante reduzido. Embora não tenha sido detectada produção de NO nos grupos de M $\phi$ s infectados com La e Lb, o bloqueio da produção dessa molécula, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é capaz de aumentar a infecção por Lb, mas não altera a infecção por La. A avaliação da produção de IL-12, revelou que M $\phi$ s infectados com Lb produzem maior quantidade dessa citocina e apresentam uma maior expressão de RNAm de TNF- $\alpha$  nas primeiras 6h após infecção que os infectados por La. Por outro lado, a infecção com La induz uma maior produção de TGF- $\beta$ , maior expressão de RNAm de IL-10 e menor expressão de RNAm de quimiocinas e receptores dessas moléculas em relação ao grupo infectado com Lb. A investigação da atividade de arginase de La e Lb demonstrou que promastigotas de La apresentam uma elevada atividade de arginase, apresentando-se aproximadamente 50 a 100 vezes maior que nos promastigotas de Lb. Esses dados correlacionam-se com a maior carga parasitária e maior sobrevivência desse parasito no interior dos M $\phi$ s, enquanto que a menor atividade dessa enzima em Lb pode estar relacionada com a baixa carga parasitária, alta susceptibilidade aos mecanismos microbicidas dos M $\phi$ s e uma conseqüente diminuição na sobrevivência dessa espécie de *Leishmania*. Esses dados demonstram que La e Lb induzem perfis diferentes de resposta à infecção, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e sugerem que fatores produzidos pelo parasito, a exemplo de arginase, podem estar envolvidos no desenvolvimento desses perfis diferenciados de resposta. Palavras-chave: Macrófago. *Leishmania amazonensis*. *Leishmania braziliensis*. Citocinas. Quimiocinas. Óxido nítrico. Arginase.

*Macrophages (M $\phi$ s) are cells that play an important role in the control of infection by Leishmania. In this work, we investigated some factors and mechanisms that could be related to the different responses of BALB/c peritoneal M $\phi$ s infected in vitro with L. amazonensis or L. braziliensis. We observed that IFN- $\gamma$  alone was not able to reduce the infection by both Leishmania species. However, association of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  resulted in a decrease of the percentual of M $\phi$ s infected by Lb 72 h after infection, but not by La. Pre-treatment with IFN- $\gamma$  or IFN- $\gamma$  plus TNF- $\alpha$  did not change the viability of L. amazonensis compared to non-treated group. Nevertheless, L. braziliensis was susceptible to the action of IFN- $\gamma$  because pre-treatment with this cytokine was sufficient to reduce the number of viable Lb isolated from M $\phi$ s. The synergy of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  was highly effective in this group and resolved the infection. We were not able to detect NO production by M $\phi$ s infected with La or Lb. However, NO inhibition, in vitro and in vivo, increased Lb infection and did not change La infection. Lb infected M $\phi$ s produced more IL-12 than La infected ones. Furthermore, M $\phi$ s infected with Lb expressed more mRNA to TNF- $\alpha$ , chemokines and chemokine receptors than M $\phi$ s infected with La. On the other hand, La induced a high production of TGF- $\beta$  and IL-10 by M $\phi$ s in relation to Lb. Arginase activity of parasites was evaluated and showed that La promastigotes had an arginase activity 50 to 100 times higher than Lb promastigotes. These data correlated to high parasite burden and survival of La in the M $\phi$ s. On the contrary, low arginase activity in Lb is related to a low parasite burden and high susceptibility of the Lb to the M $\phi$ s killing mechanisms. These data demonstrate that La and Lb induce different responses to infection, in vitro and in vivo, and suggest that factors produced by parasite, such as arginase, could be involved in the development of these profiles.*

*Key words: Macrophage. Leishmania amazonensis. Leishmania braziliensis. Cytokines. Chemokines. Nitric oxide. Arginase.*

## **AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE PROTETORA CONFERIDA PELA IMUNIZAÇÃO DE HAMSTERS COM SALIVA DO FLEBOTOMÍNEO *LUTZOMYIA LONGIPALPIS* CONTRA DESAFIO COM *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* NA PRESENÇA DA SALIVA DE DIFERENTES VETORES**

### **EVALUATION OF PROTECTIVE IMMUNITY CONFERED BY IMMUNIZATION WITH SALIVA FROM LUTZOMYIA SAND FLY AGAINST CHALLENGE WITH *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* PLUS SALIVA FROM DIFFERENT VECTORS IN HAMSTERS**

Natalia Machado Tavares

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA

C-e-lo: nmachado@bahia.fiocruz.br

Transmitidas por diferentes espécies de flebotomos, as leishmanioses apresentam uma grande variedade de manifestações clínicas. Tem sido demonstrada, a possibilidade de imunização contra a infecção por *Leishmania* utilizando-se a saliva do vetor flebotômico *Lutzomyia longipalpis*. O principal vetor da *Leishmania braziliensis* é o flebotomo *Lutzomyia intermedia*. O objetivo deste estudo foi avaliar se a imunização de hamsters com a saliva de *L. longipalpis* confere proteção contra a infecção por *L. braziliensis* na presença da saliva de *L. intermedia*. Hamsters machos foram imunizados com o Sonicado de Glândula Salivar (SGS) por três vezes com intervalo de quinze dias. O desafio foi feito na orelha contra-lateral quinze dias após a última imunização, com  $10^5$  formas promastigotas de *L. braziliensis* na presença do SGS de *L. intermedia*. O desenvolvimento da lesão foi acompanhado semanalmente e 3, 5 e oito semanas, após o desafio, as orelhas e linfonodos drenantes foram retirados para avaliação da carga parasitária, bem como da produção de citocinas durante a infecção. Quarenta e oito horas após o desafio com SGS, observa-se um infiltrado inflamatório composto predominantemente de células mononucleares nas orelhas dos animais imunizados. Estes animais apresentam redução significativa na carga parasitária dos linfonodos drenantes, bem como das orelhas desafiadas. Além disso, produzem significativamente mais anticorpos anti-saliva quando comparados aos não-imunizados e menos anticorpos anti-*Leishmania*. Os possíveis mecanismos envolvidos nesta proteção são os níveis reduzidos na expressão de IL-10 e TGF- $\beta$  ao longo da infecção. Estes resultados sugerem que a imunização com o SGS de *L. longipalpis* confere proteção contra a infecção por *L. braziliensis* de modo inespecífico à presença da saliva no momento do desafio. Dessa forma, a possibilidade de vacinação contra diferentes espécies de *Leishmania*, utilizando proteínas salivares de uma espécie de vetor.

Palavras-chave: *Leishmania*. *Lutzomyia longipalpis*. Imunização.

*Transmitted by different species of sand flies, leishmaniasis presents a large spectrum of clinical manifestations. It has been shown the possibility of immunizing against Leishmania infection using Lutzomyia longipalpis saliva. Lutzomyia intermedia is the main vector of Leishmania braziliensis. We investigated here whether the immunization of hamsters with L. longipalpis saliva confers protection against L. braziliensis infection in the presence of L. intermedia saliva. Old male hamsters were immunized with L. longipalpis Salivary Gland Sonicate (SGS) three times, at fifteen-day intervals. Fifteen days after last immunization, the animals were challenged on the lateral ear with  $10^5$  L. braziliensis promastigotes plus SGS from L. intermedia. Lesion development was measured weekly and 3, 5 and 8 weeks, after challenge, ears and draining lymph nodes were obtained to evaluate parasite load as well as cytokines produced during the infection. Forty-eight hours after challenge with SGS, we observed an inflammatory infiltrate predominantly composed of mononuclear cells in the ears of immunized hamsters. These animals showed also significantly lower number of parasites in the ear and in the draining lymph nodes. They also produced significantly more antibodies against saliva when compared with non-immunized hamsters and less antibodies anti-Leishmania. The possible mechanism under this response is the reduced levels of IL-10 and TGF- $\beta$  during the infection. These results suggest that the immunization with SGS from L. longipalpis confers protection against L. braziliensis infection in an independent way of the presence of saliva in the challenge. Also, the possibility to vaccinate against different species of Leishmania using salivary proteins from only one sand fly species.*

Key words: *Leishmania*. *Lutzomyia longipalpis*. Immunization.

## **ESTUDO SOBRE A CITOTOXICIDADE DO CATECOL, UM METABÓLITO DO BENZENO, NA LINHAGEM N2A DE NEUROBLASTOMA MURINO**

### **STUDY OF THE CYTOTOXICITY OF CATECHOL, A METABOLITE OF BENZENE, TO MURINE NEUROBLASTOMA N2A CELLS**

Rute Maria Ferreira Lima

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA

C-elo: rutrnute@gmail.com

O 1,2-diidroxibenzeno (catecol) é um metabólito do benzeno que se oxida em pH neutro gerando como produtos finais espécies reativas de oxigênio (EROs) e quinonas. Sabe-se que o estresse oxidativo está envolvido na etiopatogenia de diversas doenças do sistema nervoso central e que o glutatión reduzido (GSH) tem um papel central na defesa antioxidante do cérebro. Além disso, essa coenzima é importante na detoxificação de xenobióticos. Ainda, a depleção de GSH está relacionada com a morte celular neuronal. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos de toxicidade do catecol em células de neuroblastoma murino (N2a). Para isso, determinou-se a dose mínima letal e a concentração capaz de matar 50 % ( $EC_{50}$ ) das células a partir do emprego do reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Investigou-se a auto-oxidação do catecol no meio de cultura através da produção de quinonas espectrofotometricamente a 405 nm. Avaliou-se o papel do radical superóxido e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) tratando-se as células com catecol na presença de superóxido

dismutase (SOD, 300 U) e catalase (CATL, 10.000 UI) respectivamente. Após a determinação de suas respectivas  $EC_{50}$ , tratou-se as células com L-cisteína (0,03-6 mM), N-acetil-L-cisteína (NAC) (0,03-6 mM), curcumina (0,001-0,01 mM), desferrioxamina ( $2 \times 10^{-5}$ -0,003 mM), ácido ascórbico (0,01-2 mM), MnTBAP (0,001-1 mM), c-PTIO (0,001-0,03 mM), permitindo-se avaliar o efeito protetor contra a toxicidade induzida por 60  $\mu$ M de catecol. Obteve-se o padrão de morte celular através de análises de citometria de fluxo com marcação para anexina V e iodeto de propídio. Analisou-se a depleção de GSH a partir de marcação com monoclorobimano (MCB). Os resultados revelam que catecol foi citotóxico para as células N2a, após 72 horas, com uma dose mínima letal de 20  $\mu$ M e com  $EC_{50}$  de 38,5  $\mu$ M. Não houve correlação entre a formação de quinonas reativas com a citotoxicidade do catecol. Dentre os antioxidantes avaliados somente a L-cisteína e a NAC, apresentaram significativamente uma relação dose-resposta, entretanto essas mesmas substâncias não foram hábeis em proteger totalmente contra os efeitos deletérios de 60  $\mu$ M de catecol. A SOD aumentou o efeito citotóxico do catecol e a CATL associada com a SOD reverteu esse efeito. Entretanto, parece que a concentração extracelular de  $H_2O_2$  formado durante a oxidação do catecol não é tóxica, uma vez que a catalase sozinha não protegeu as células contra a citotoxicidade induzida por este composto. Isto sugere que na concentração de catecol avaliada o superóxido e  $H_2O_2$  formados não foram responsáveis pela morte celular. A marcação com MCB revelou depleção de GSH após 24 horas, e a análise citométrica revelou apoptose após 72 horas. Desta forma, os dados indicam que a morte celular ocorre por apoptose e um dos mecanismos prováveis de toxicidade do catecol parece ser a depleção de GSH em células de N2a.

Palavras-chave: Catecol. Citotoxicidade. Neuroblastoma.

*The 1,2-dihydroxybenzene (catechol) is a metabolite of benzene, which is oxidized at neutral pH, generating reactive oxygen species (EROs) and quinones as final products. It is known that oxidative stress is involved in the pathogenesis of several diseases of the central nervous system and that reduced glutathione (GSH) plays a central role in the antioxidant defense of the brain. Moreover, this coenzyme is important in the detoxification of xenobiotics. Still, the depletion of GSH is related to the neuronal cell death. The objective of the present work was to investigate the mechanisms of toxicity of catechol in murine neuroblastoma cells (N2a). Therefore, the minimum lethal dose and the concentration able to kill 50 % of cells was determined by the use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). The auto-oxidation of catechol in the culture medium was investigated by the measure of the optical densities of quinones spectrophotometrically at 405 nm. The role of superoxide radical and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) was evaluated by adding superoxide dismutase (SOD, 300 U) and/or catalase (CATL, 10.000 IU) in the medium of cells exposed to catechol. Furthermore, the protective effect of the following drugs was tested after the determination of their  $EC_{50}$ : L-cysteine (0.03-6 mM), N-acetyl-L-cysteine (NAC) (0.03-6 mM), curcumin (0.001-0.01 mM), desferrioxamine ( $2 \times 10^{-5}$ -0.003 mM), ascorbic acid (0.01-2 mM), MnTBAP (0.001-1 mM), c-PTIO (0.001-0.03 mM). The depletion of GSH was analyzed by using monochlorobimane (MCB). The type of cell death was obtained by flow cytometry analysis of cells labeled with annexin V and propidium iodide. The results showed that catechol was cytotoxic to N2a cells, after 72 hours, with a minimum lethal dose of 20  $\mu$ M and with  $EC_{50}$  of 38.5  $\mu$ M. There was no correlation between the formation of reactive quinones and the cytotoxicity of catechol. Among the evaluated antioxidants only the L-cysteine and NAC showed a significant dose-response protection, however these substances were not able to fully protect cells against the deleterious effects of 60  $\mu$ M catechol. SOD increased the cytotoxic effect of catechol and CATL associated with SOD reversed this effect. However, it seems that the  $H_2O_2$  is not formed in the extracellular environment during the oxidation of catechol, since CATL alone did not protect cells against catechol-induced cytotoxicity. These data suggest that formation of superoxide and  $H_2O_2$  during the spontaneous oxidation of catechol were not responsible for the cell death. A depletion of GSH was detected after 24 hours. Flow cytometry analysis revealed apoptosis after 72 hours. Thus, these data indicate that the cell death occurs by apoptosis and one of the main mechanisms of catechol-induced toxicity seems to be the depletion of GSH in N2a cells.*

*Key words: Catechol. Cytotoxicity. Neuroblastoma.*

## **PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS DO SUBTIPO 5-HT<sub>3</sub>, LOCALIZADOS NA ÁREA SEPTAL MEDIAL (ASM) SOBRE O CONTROLE DA INGESTÃO DE ÁGUA E SAL EM RATOS SÓDIO-DEPLETADOS**

### **PARTICIPATION OF 5-HT<sub>3</sub> SEROTONERGIC RECEPTORS IN THE SEPTAL MEDIAL AREA IN THE CONTROL OF WATER AND SALT INTAKE IN SODIUM-DEPLETED RATS**

Anderson Pereira Souza

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA

C-e-lo: anderson@aluno.bahia.fiocruz.br

A regulação do equilíbrio hidroeletrólítico é desempenhada por diversas vias neurotransmissoras e áreas cerebrais. Para tal, um conjunto de mecanismos viscerais e comportamentais, nos quais se incluem a ingestão de água e sal, são recrutados. Estudos sugerem a participação de mecanismos serotoninérgicos na indução das respostas fisiológicas relacionadas com a regulação hidrossalina. Trabalhos anteriores demonstraram também que a integridade da área septal é necessária para a regulação da ingestão de água e sal. Por isso, em nosso trabalho estudamos o envolvimento dos receptores 5-HT<sub>3</sub> serotoninérgicos localizados na ASM sobre a ingestão de água e sal em ratos sódio-depletados. Verificamos que a administração de m-CPBG, agonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>, estimulou a ingestão de sal em ratos sódio-depletados. O pré-tratamento com ondansetrona, antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>, aboliu completamente a elevação na ingestão de sal produzida pela administração do m-CPBG. Esse efeito natriorexigênio parece não ser dependente de alterações na pressão arterial, visto que a micro-injeção de m-CPBG na ASM não modificou esse parâmetro. Além disso, constatamos que a administração isolada do antagonista ondansetrona não produziu qualquer efeito sobre a ingestão de água e sal nos ratos sódio-depletados. Dessa forma, os resultados indicam que os receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT<sub>3</sub> localizados na ASM desempenham importante papel na ingestão de sal em ratos sódio-depletados, produzindo um potente efeito estimulatório. Palavras-chaves: Equilíbrio. Ingestão. Água. Ratos.

*In a complex interplay, several visceral and behavioral mechanisms participate in the control of hydrosaline balance. Water and salt intake, crucial behavioral mechanisms in this homeostatic system, are regulated by several brain areas and distinct neurotransmitters. Previous data have shown that brain serotonergic pathways play a significant role in these phenomena. It has been demonstrated that the functional integrity of the septal area is essential for the brain control of water and salt intake. In the present study, we investigated the role of 5-HT<sub>3</sub> receptors within the medial septal area in the control of water and salt intake in sodium depleted rats. The data obtained show that the administration of a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist, m-CPBG, into the septal medial area significantly increases salt intake in sodium depleted animals. This effect seems to be due to the specific activation of 5-HT<sub>3</sub> receptors located in this area since pretreatment with ondansetron, a selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, blocks the effect induced by m-CPBG. The administration of the 5-HT<sub>3</sub> antagonist alone into the same area was devoid of effect. The natriorexigenic observed after the administration of m-CPBG into the septal medial area was not dependent on changes in blood pressure since the compound injected into the same area was unable to modify this parameter. The present data, as related above, suggest that 5-HT<sub>3</sub> receptors located in the septal medial area may have an important stimulatory role in the regulation of salt intake in sodium depleted rats.*

*Key words: Control. Intake. Water. Rats.*

## **CLONAGEM, EXPRESSÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DO GENE RV1419 DO *MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

## **CLONING, EXPRESSION AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF RV1419 GENE FROM *MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Lucas de Lima Nogueira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA

C-elo: lucasn@bahia.fiocruz.br

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada por um patógeno exclusivamente humano, o *Micobacterium tuberculosis* (Mtb). Nosso objetivo foi avaliar se uma nova lectina do Mtb, RV1419, apresenta um papel modulatório em macrófagos J774 *in vitro*, assim como investigamos a resposta imune celular de pacientes com tuberculose. Um banco de dados de lectinas, de diferentes espécies, foi construído para a mineração das seqüências de proteínas hipotéticas que foram geradas a partir da análise do genoma de *Micobacterium tuberculosis* H37Rv. Identificamos uma proteína hipotética codificada pelo gene Rv1419 e produzimos a proteína recombinante. Observamos que a produção de TNF- $\alpha$  induzida pela proteína recombinante foi dependente do tempo e da dose, mas independente do domínio lectínico. Observamos também por imunofluorescência que a proteína recombinante foi capaz de interagir com a superfície celular de macrófagos J774 em cultura. Em adição, nós observamos que níveis detectáveis de citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e TH2 (IL-10) foram secretadas por CMSP de pacientes com tuberculose em resposta à proteínas do filtrado de cultura do bacilo (CFP) e à proteína recombinante, demonstrando que o estado imunológico dos pacientes não estava comprometido.

Palavras-chave: *Micobacterium tuberculosis*. Tuberculose. Lectinas. Bioinformática.

*Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Micobacterium tuberculosis*, which is an obligatory human pathogen. Our objective was to evaluate whether one novel lectin from *M. Tuberculosis*, Rv1419p, has a modulatory role in macrophages J774 in vitro. Moreover, we investigated the cellular immune response of TB patients. A data base of lectins from different species was carried out in order to search hypothetical protein sequences that were generated from the analysis of the *M. Tuberculosis* H37Rv genome. We identified a hypothetical protein codified by Rv1419 gene and the recombinant protein production was then performed. We observed that TNF- $\alpha$  production induced by re-RV1419p was time and dose-dependent, but lectin-independent. In parallel experiments, we observed that re-Rv1419p was able to interact with J774 macrophages, particularly at a cell surface level. In addition, we observed that detectable levels of Th1 (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e Th2 (IL-10) cytokines were secreted by PBMC of TB patients in response to culture filtrate proteins (CFP), which are known to contribute to the immunology of tuberculosis, and single antigen (re-Rv1419p). These results indicate that the immune status of pulmonary TB patients included in the study was not compromised.*

*Key words: *Micobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. Lectins. Bioinformatics.*

## CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS T REGULADORAS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

### PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF REGULATORY T CELLS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS

Sarah de Athayde Couto Falcão

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental da FMB-UFBA

C-elo: sc-falcao@uol.com.br

A leishmaniose tegumentar (LT) constitui um grave problema de saúde pública no Brasil. As células T reguladoras (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) (T<sub>regs</sub>) executam um papel geral na regulação imune, prevenindo uma resposta imune patológica induzida. As T<sub>regs</sub> naturais são definidas a partir da expressão constitutiva de CD25, CTLA-4, GITR, CD103 e FoxP3, entre outros marcadores. As células T<sub>regs</sub>, ao se acumularem no sítio de infecção por *Leishmania*, suprimem a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, levando à persistência do parasita por mecanismos dependentes de IL-10. Nosso objetivo foi caracterizar a população de células T<sub>regs</sub> em camundongos BALB/c infectados e re-infectados com *L. braziliensis* e avaliar se estas células estão relacionadas com a persistência do parasita. Células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, obtidas de camundongos infectados, expressam diferentes marcadores de superfície de T<sub>regs</sub> (CD103, GITR, FoxP3) e foram capazes de suprimir a proliferação das células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Observamos também a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 por parte de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Observamos que os parasitas persistem no linfonodo e no baço no curso da infecção, contudo, na orelha, o número de parasitas diminui com a cicatrização da lesão. Observamos também que não há reativação da lesão após o desafio. Nossos resultados mostram que as células T<sub>regs</sub> estão presentes na infecção experimental por *L. braziliensis* e sugerem que estas células estão associadas com a ausência de reativação da doença após um desafio.

**Palavras-chaves:** *Leishmania braziliensis*. Células T<sub>regs</sub>. BALB/c. Leishmaniose Tegumentar Americana.

*Tegumentary leishmaniasis (TL) constitutes a serious problem of public health in Brazil. Regulatory T cells (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) (T<sub>regs</sub>) play an important role in immune regulation, preventing pathological immune responses. Natural T<sub>regs</sub> cells are defined by constitutive expression of CD25, CTLA-4, GITR, CD103 and FoxP3 amongst other markers. T<sub>regs</sub> cells, when accumulated at the site of infection by *Leishmania*, suppress the proliferation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells, leading to the persistence of parasite by IL-10-dependent mechanisms. Our objective was to characterize the T<sub>regs</sub> cell population in BALB/c mice infected and re-infected with *L. braziliensis* and to evaluate whether these cells are related with the persistence of the parasite. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells, obtained from infected mice, expressed different T<sub>regs</sub> surface markers (CD103, GITR and FoxP3) and were able to suppress proliferation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells. We also observed the production of IFN- $\gamma$  and IL-10 by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells. We observed that the parasites persist in the draining lymphnode and spleen during infection, although, in the ear, the number of parasites decreases with clinical cure. We also observed that there is no reactivation of lesion post challenge. Our results show that T<sub>regs</sub> cells are present in the experimental infection by *L. braziliensis* and suggest that these cells are associated with the absence reactivation of disease after a challenge.*

**Key words:** *Leishmania brasiliensis*. T<sub>regs</sub> cells. BALB/c. American Tegumentary Leishmaniasis.