

Universidade Federal de Minas Gerais
Pró-Reitoria de Pesquisa

**CARACTERIZAÇÃO DE MODELO MURINO (*TNFRp55*^{-/-}) PARA
ESTUDO DE ULCERAÇÕES CRÔNICAS CAUSADAS POR
*LEISHMANIA MAJOR***

Bolsista: Paula Seixas Mello, desde março de 2009. Com renovações em agosto de 2009 e em agosto de 2010 (processo número: 129260/2011-8)

Orientador: Leda Quercia Vieira

Título do projeto: Avaliação dos mecanismos de redução das lesões em camundongos infectados com *Leishmania major* tratados com células purificadas da medula óssea: uma proposta de terapia celular para leishmaniose muco-cutânea

Curso: Ciências Biológicas

Período: Continuidade de estudos

Belo Horizonte
Agosto de 2010 .

Identificação:**Nome do bolsista** Paula Seixas Mello**Número de Matrícula** 2008400195**Nome do curso** Ciências Biológicas**Nome do orientador** Leda Quércia Vieira**Título do projeto de pesquisa do orientador** Avaliação dos mecanismos de redução das lesões em camundongos infectados com *Leishmania major* tratados com células purificadas da medula óssea: uma proposta de terapia celular para leishmaniose mucocutânea**Informe se o projeto foi avaliado ou se foi encaminhado para avaliação pelo Comitê de Ética pertinente. Informe também o número do protocolo de entrega.** O projeto já foi aprovado pelo CETEA, PROTOCOLO CETEA: 55/2009.**COEP para projetos que envolvam seres humanos****CETEA para projetos que envolvam animais vertebrados****Unidade/Departamento** Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Bioquímica e Imunologia**Data de ingresso como bolsista no Programa em vigência****1.5. Indique** **Bolsa Nova** **Renovação****1.6. Período do relatório:** agosto de 2010 a julho de 2011.**1.7. Resumo do plano de trabalho do aluno apresentado no início da bolsa**

Devido à necessidade de um aluno de Iniciação Científica para este projeto e também por questões de afinidade em relação aos experimentos, houve uma troca do plano de trabalho apresentado no início da bolsa para o plano de trabalho atual. O projeto antigo já está em fase de conclusão, ao passo que este projeto me possibilitará prosseguir com os experimentos.

Plano de trabalho do bolsista

O estudante a que se destinará esta bolsa já está familiarizado com as técnicas correntes em nosso laboratório. A ele, serão atribuídas as seguintes tarefas:

Manutenção e crescimento de parasitas: Serão utilizadas promastigotas metacíclicas de *Leishmania major*. Os parasitas serão mantidos em meio de Grace's e por passagem em camundongos BALB/c

Manutenção de animais experimentais: Serão utilizados camundongos BALB/c e C57BL/6 provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais e camundongos TNFRp55-/- no fundo C57BL/6 provenientes do biotério de criação de nosso laboratório. Estes serão mantidos em nosso biotério experimental em estantes ventiladas.

Infecção e tratamento dos animais: TNFRp55-/- infectados com *L. major* serão tratados com 1×10^7 células obtidas da medula óssea do fêmur de camundongos TNFRp55-/- não infectados, camundongos C57BL/6 selvagens ou camundongos C57BL/6 expressando a proteína verde fluorescente constitutivamente. Vários tempos de tratamento e doses de células serão testados. Análises histopatológicas, bem como mensagem e dosagem das citocinas (IFN- γ , IL-10, IL-4, TNF- α), enzimas de macrófagos (iNOS) e análise do fenótipo das células por citometria de fluxo (células T e B, macrófagos, dendríticas) serão realizadas no tecido infectado e órgão linfóides drenantes da infecção.

Participação em reuniões científicas locais e nacionais, com apresentação de resumo.

MELLO, P.S ; ALMEIDA, D. M. ; CARNEIRO, M. B. H. ; UTSCH, L.G ; ARANTES, R. ; VIEIRA, L. Q.. CHARACTERIZATION OF A MURINE MODEL (TNFRP55-/-) FOR STUDY OF CHRONIC CUTANEOUS LESIONS BY LEISHMANIA MAJOR INFECTION – Resumo aceito para apresentação na modalidade pôster no dia 20/09/2011, no congresso da Sociedade Brasileira de Protozoologia, em Foz do Iguaçu.

Participação como apresentador das reuniões de laboratório.

Em 23/05/2011, apresentei na reunião de laboratório o trabalho “Jan M. Ehrchen^{1,2,3,.}, Kirsten Roebrock^{1,3,.}, Dirk Foell^{1,3,} Nadine Nippel^{1,} Esther von Stebut^{4,} Johannes M. Weiss^{5,} Niels-Arne Muñck^{1,} Dorothee Viemann^{1,3,6,} Georg Varga^{1,} Carsten Müller-Tidow^{3,7,} Hans-Joachim Schuberth^{8,} Johannes Roth^{1,3*,} Cord Sunderkotter . **Keratinocytes Determine Th1 Immunity during Early Experimental Leishmaniasis.** In: [PLoS Pathog.](#) 2010 Apr 29;6(4):e1000871.”

1.8. Relatório de atividades do bolsista. Em relação ao plano de trabalho proposto, liste:

Atividades realizadas

Manutenção de cultura de *Leishmania major*

Purificação de formas promastigotas metacíclicas por gradiente de ficoll
Manutenção de animais experimentais
Extração de células de medula de camundongos para tratamento de animais infectados
Citometria de fluxo
Técnicas para análise histopatológica

Participações em cursos extracurriculares, seminários, jornadas, congressos, visitas técnicas, trabalho de campo etc.

Trabalhos publicados, aceitos ou submetidos para publicação no período (anexe cópias de separatas)

Trabalho aceito para publicação

**Characterization of chronic cutaneous lesions from TNF receptor 1 deficient mice
infected by *Leishmania major***

Carolina Ferreira Oliveira^{1*}; Daniel Manzoni-de-Almeida^{1,2*}; **Paula Seixas Mello¹**; Caio Cotta Natale¹; Helton da Costa Santiago¹; Luíza da Silva Miranda³; Fernanda Oliveira Ferraz²; Liliane Martins dos Santos¹; Mauro Martins Teixeira¹; Rosa Maria Esteves Arantes³
and Leda Quercia Vieira^{1,2}.

Introdução e fundamentação

As leishmanioses são doenças provocadas pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania*. São doenças endêmicas das regiões tropicais, subtropicais, abrangendo áreas de florestas úmidas nas Américas e desertos no oeste da Ásia, presentes em áreas rurais e urbanas (Herwaldt 1999). Há em todo mundo aproximadamente 12 milhões de casos, e estimativas mostram o surgimento de 400.000 novos casos anuais dessas doenças no Novo e Velho Mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 350 milhões de pessoas estão ameaçadas de contrair a doença em 88 países. A partir de 1993, a Organização Mundial de Saúde considera a Leishmaniose como a segunda doença de importância pública causada por protozoários (Organização Mundial de Saúde).

Há duas principais formas das manifestações clínicas da leishmaniose: a tegumentar e a visceral. A forma visceral pode ser causada pela infecção das espécies *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo. É caracterizada por febre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, hipergamaglobulina, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressiva podendo levar à caquexia e ao óbito. A forma cutânea pode ser causada pela infecção das espécies de parasitas *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* descritas em casos no Velho Mundo; e *L. amazonensis*, *L. brasiliensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana* nos casos do Novo Mundo (Herwaldt 1999). A leishmaniose tegumentar é uma manifestação multifacetada que pode atingir a pele e, em alguns casos, as mucosas. A leishmaniose cutânea é caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas na derme, com ulceração na

epiderme. O espectro de suas manifestações inclui lesões localizadas na pele e que podem ter cura espontânea (Desjeux 2004). A leishmaniose muco-cutânea é manifestada em cerca de 3% dos pacientes brasileiros e é causada por *L. braziliensis*, do complexo “*braziliensis*” (Barral et al. 1993). A leishmaniose muco-cutânea é caracterizada por lesões destrutivas e crônicas, devidas a uma resposta imune celular exacerbada. Estas lesões acometem regiões da mucosa nasal e cartilagens das regiões adjacentes, meses ou anos após uma lesão cutânea preliminar, causando mutilações e morbidade nos indivíduos afetados (Castes et al. 1993).

Há pouco entendimento dos mecanismos patológicos e imunológicos que envolvem o aparecimento da leishmaniose muco-cutânea, sua progressão e a destruição das regiões nas mucosas. Os estudos efetuados até o presente momento foram concebidos e analisados nas amostras das lesões em humanos, pois não há modelo experimental, em particular o murino, para mimetizar essa forma de leishmaniose.

Algumas hipóteses são discutidas sobre as possíveis causas do acometimento das regiões das mucosas nos pacientes que sofrem de leishmaniose muco-cutânea, como a persistência de antígenos dos parasitos, a resistência de alguns parasitos à eliminação (como por exemplo, a resistência dos parasitos ao estresse oxidativo e conseqüente disseminação pelo organismo) (Acestor et al. 2006) ou a resposta imune exacerbada no local, devido a falhas nos mecanismos da regulação do processo inflamatório (Faria et al. 2005).

Dados experimentais mostram que em pacientes acometidos pela leishmaniose muco-cutânea há maior predomínio de uma resposta imune do padrão Th1. Os dados para essa hipótese mostram um número maior de células T CD4⁺ que de linfócitos T CD8⁺ nas lesões desses pacientes e uma maior produção das citocinas do padrão Th1 (IFN- γ , IL-2 e TNF- α) por estas células (Silveira, Lainson, & Corbett 2004). No soro desses pacientes há maior concentração de TNF- α que em soro de pacientes com a forma cutânea e essas concentrações elevadas de TNF- α foram associadas ao curso crônico e destruição tecidual nessa forma da doença (Da-Cruz et al. 1996).

Modelos em camundongos: susceptibilidade e resistência à infecção por L. major

A grande maioria do conhecimento sobre a imunidade à leishmaniose cutânea vem dos estudos realizados em camundongos isogênicos e geneticamente deficientes em moléculas de importância na resposta imune. Nas linhagens isogênicas, é estabelecido que camundongos BALB/c são susceptíveis a infecção por *L. major*, desenvolvendo lesões cutâneas progressivas, crescimento descontrolado do parasita com conseqüente visceralização e morte do animal. Algumas outras linhagens de camundongos isogênicos, como por exemplo, C3H/HeJ e C57BL/6, são ditas resistentes à infecção por *L. major*, uma vez que são capazes de controlar a lesão causada após a infecção.

Em meados da década de 80 do século XX, foi estabelecido o paradigma da dicotomia da resposta imune mediada por células T CD4⁺ em células Th1 e Th2 (Coffman et al. 1991). Basicamente, os subtipos de células T CD4⁺ Th1 e Th2 são identificados pela produção de um perfil de citocinas característico, sendo que camundongos C57BL/6 infectados com *L.*

major desenvolvem uma resposta predominantemente Th1 com a produção de IFN- γ , TNF- α , conseqüentes produção de IgG2a e ativação de macrófagos com eliminação dos parasitas. Entretanto, camundongos BALB/c tendem a desenvolver uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela alta produção de IL-4, IL-5, IL-13, e conseqüentemente o subtipo de imunoglobulina IgG1 (Sacks & Noben-Trauth 2002).

Para estudos da leishmaniose muco-cutânea não há modelo murino experimental. As lesões causadas pela infecção com *L. major* em camundongos C57BL/6 nocautes para o gene do receptor 1 do TNF- α (TNFRp55^{-/-}) guardam algumas semelhanças com aquelas de pacientes com este tipo de forma clínica da doença. Vieira e colaboradores (1996) descreveram, pela primeira vez, que camundongos TNFRp55^{-/-} infectados com *L. major* desenvolvem uma lesão não cicatrizante, não progressiva e que também não é auto limitante como as lesões encontradas em camundongos C57BL/6 selvagens. Interessantemente, esses animais após a 11^a semana de infecção têm a capacidade de controlar o parasitismo em níveis semelhantes aos camundongos selvagens, entretanto as lesões permanecem pelo menos até 20 semanas de infecção, sem a resolução do infiltrado inflamatório. Nashleanas e colaboradores (1998) mostraram que macrófagos derivados desses camundongos são incapazes de produzir NO e controlar o parasitismo após o estímulo com IFN- γ in vitro, entretanto, in vivo esses animais conseguem produzir uma resposta Th1, expressar iNOS no sítio da infecção e controlar a replicação de *L. major*. Esses dados sugerem que células T podem ativar os macrófagos desses animais para induzir NO por uma via independente de TNF- α , como por exemplo, por meio de CD40/CD40L (Vieira et al., 1996; Nashleanas & Scott 2000).

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica que exerce várias atividades biológicas, como por exemplo a apoptose celular mediada pelo receptor 1 em vários tipos celulares (Zhao et al. 2000). A eliminação de linfócitos da lesão inflamatória é um componente crítico na resolução da resposta inflamatória após a eliminação do patógeno (Kanaly et al. 1999). Resultados do nosso grupo mostram que há uma deficiência na taxa de apoptose em camundongos TNFRp55^{-/-} quando comparados aos camundongos selvagens, na fase tardia da infecção por *L. major*, quando o controle do parasitismo foi obtido. Esses dados sugerem que o defeito na resolução do infiltrado inflamatório pode estar relacionado a uma taxa menor de apoptose de células inflamatórias do local de lesão (Oliveira et al, 2005).

Objetivos

O presente estudo tem por objetivo a caracterização da infecção cutânea crônica desenvolvida em camundongos TNFRp55^{-/-} infectados por *Leishmania major*.

Metodologia

Camundongos

Camundongos C57BL/6 foram obtidos do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO) e camundongos TNFRp55^{-/-} obtidos da colônia de camundongos nocautes do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, respectivamente. Os animais foram mantidos no biotério experimental do Laboratório de Gnotobiologia e

Imunologia do Depto de Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG em estante ventilada, recebendo ração, cama e água estéreis. Todos os procedimentos foram executados de acordo com os protocolos institucionais e internacionais que regulam a experimentação em animais.

Parasitas

A *Leishmania major* (MHOM/IL/1980/Friedlin) foi mantida em meio de Grace conforme descrito (Afonso & Scott 1993). Para infecção foram utilizadas formas promastigotas metacíclicas purificadas por centrifugação em gradiente de Ficoll (Späth & Beverley 2001).

Infecção na pata por L. major

Camundongos C57BL/6 e TNFRp55^{-/-} foram inoculados com 20 µL de PBS na pata direta contendo 1x10⁶ parasitos na forma metacíclicas de *L. major*. A análise do desenvolvimento e das lesões foi acompanhada e medida com auxílio paquímetro digital (Starrett 727, Itu, SP, Brasil) e os resultados expressos com a diferença de espessura entre a pata infectada e a pata não-infectada dos animais controle.

Quantificação de parasitas

O número de parasitas na pata infectada dos animais foi determinado pela técnica de diluição limitante. Os homogenatos das patas foram obtidos após maceração manual das lesões e material foi centrifugado a 250 x g. Os sobrenadantes recuperados foram submetidos a uma posterior centrifugação de 1.000 x g. O sedimento obtido foi suspenso em 400 µL de meio Grace's completo e duzentos microlitros dessa suspensão foram colocados em duplicata em placas de cultura de 96 poços. Posteriormente foram serialmente diluídas 1:10 e incubadas à 25C durante 15 dias para seguir o crescimento das promastigotas. O número de parasitos foi expresso em forma de logaritmo negativo da última diluição em que foi constatada a presença/crescimento dos parasitos.

Análise do infiltrado inflamatório por histologia

A análise do perfil citológico na lesão cutânea dos animais foi inicialmente realizada a partir de cortes histológicos dos locais de lesão em 2,6,15 e 20 semanas após o inoculo. As lesões foram coletadas após o sacrifício dos animais e fixadas em formol 10% pH 7,2, desidratadas e, posteriormente, diafanizadas em xilol antes da inclusão em parafina. Foram realizados cortes histológicos seriados de 5µm de espessura em micrótomo de rotação SPENCER (Leica MicrosystemsGmbH, Wetzlar, Alemanha), os quais foram montados em lâminas e corados segundo as técnicas de Hematoxilina- Eosina. As análises histológicas foram desenvolvidas sob microscopia de luz usando 400 vezes de aumento.

Citometria de fluxo

Lesões de patas infectadas de camundongos selvagens e TNFRp55^{-/-} foram removidas na 6^a e 15^a semanas de infecção. Os tecidos foram macerados, centrifugados a 600 x g e suas células marcadas com anti- CD4 FITC, CD3 PE, CD8 PercP, F4/80 ou Ly6G FITC (BD Pharmigen, Heidelberg, Germany). As células marcadas foram analisadas usando FACScan flow cytometer equipado com cellQuest software.

Dosagem de citocinas

A dosagem de IL-17 foi realizada por PCR em Tempo Real: detecção de mRNA pela reação em cadeia da polimerase reversa (RT-PCR) e por ELISA, em diferentes fases de infecção (6 e 15 semanas). As patas foram coletadas e mRNA foram extraídos com Trizol (GIBCO BRL Laboratories) e a detecção da citocina por RT-PCR foi realizada segundo

protocolo descrito anteriormente por Santiago et al., 2005. A extração ocorreu segundo instruções do fabricante, seguida de quantificação em espectrofotômetro. Posteriormente, 1µg de RNA foi convertido em cDNA utilizando-se 25U de Transcriptase Reversa (Promega Corp., Madison, WI, USA), em 12 µL de reação contendo 2.5 mM de dNTPs, 50 mM de TRIS/HCl (pH8.3), 75 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT (GIBCO BRL Laboratories, Grand Island, NY, USA), 250 mM de dNTP (Promega), 50 mM de Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 10 U de RNAsin (GIBCO BRL), 7.5 pM de oligo dT₁₅ (GIBCO BRL). As misturas foram incubadas por 5 min a 95 °C, 5 min a 4 °C e 5 min a 25 °C e nesta etapa, 25 U de transcriptase reversa foi adicionada aos poços e a mistura foi incubada por 60 min a 37 °C. Então, elevou-se a temperatura até 95 °C por 5 min e resfriou-se a 4 °C por 5 min. A PCR foi realizada em 10 µL por poços diluídos no seguinte tampão: 250 mM de dNTP, 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCL, 1.5 mM de MgCl₂, 5 mM de cada primer e 0.05 U de TaqPolimerase (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brazil). A PCR foi padronizada utilizando-se o gene constitutivo HPRT. Em seguida, o PCR em tempo real será realizado, em um sistema de detecção ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems, San Antonio, CA, EUA), usando-se o “master mix” SYBR Green (Applied Biosystems). O nível relativo da expressão gênica sera determinado pelo método descrito pelo fabricante.

Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste *t* Students, sendo consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05^*$.

Resultados alcançados e discussão

Com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de lesões em modelo experimental murino, foi realizado inóculo de 1×10^6 promastigotas *L. major* em camundongos C57BL/6 e TNFRp55^{-/-} e as lesões foram acompanhadas e medidas por 20 semanas. As medidas das lesões nas patas mostraram que camundongos TNFRp55^{-/-} desenvolvem lesões significativamente maiores quando comparados aos animais selvagens C57BL/6. (**figura 1**).

Nossos dados mostram que camundongos TNFRp55^{-/-} infectados com *L. major* apresentam lesões persistentes, não cicatrizantes, opostamente ao que acontece com o fenótipo resistente (camundongo C57BL/6), que apresenta a resolução da lesão em torno de 8 semanas (figura 1). Entretanto, tal perfil também não se assemelha ao perfil de susceptibilidade do animal BALBC, cujas lesões que não se cicatrizam apresentam um aumento de tamanho progressivo após a infecção por *L. major* (dados não mostrados), o que não acontece com o camundongo TNFRp55^{-/-}, cuja lesão permanece estabilizada em torno de 1,5 a 2 cm a partir da oitava semana de infecção. Com objetivo de investigar as causas da permanência das lesões nestes animais, realizou-se a determinação da carga parasitária na pata infectada. (**figura 2**)

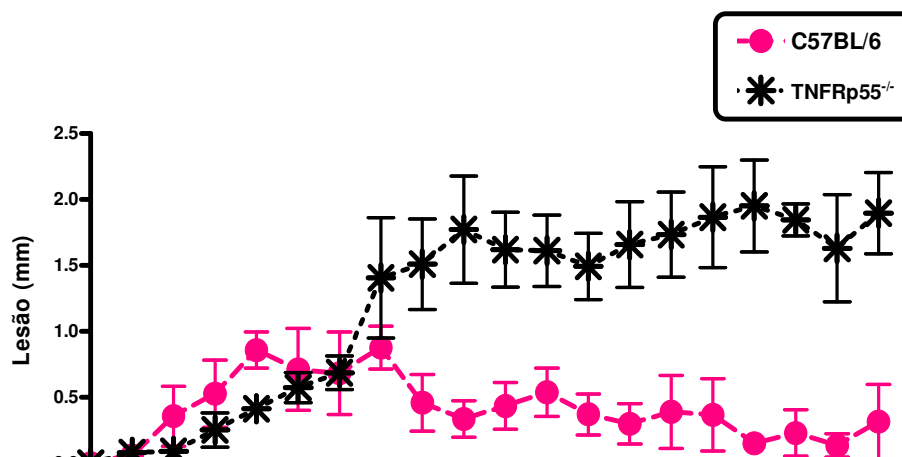


Figura 1: Curva de infecção de camundongos C57BL/6 e TNFRp55^{-/-} infectados por *L. major*. Os camundongos foram infectados com 1×10^6 de formas estacionárias de *L. major* em ambas as patas. As lesões foram semanalmente analisadas e medidas com paquímetro e a média dos valores das patas de camundongos não infectados foi subtraída de cada pata infectada para estimativa da lesão. Cada ponto representa a média de 10 patas infectadas (n=5).

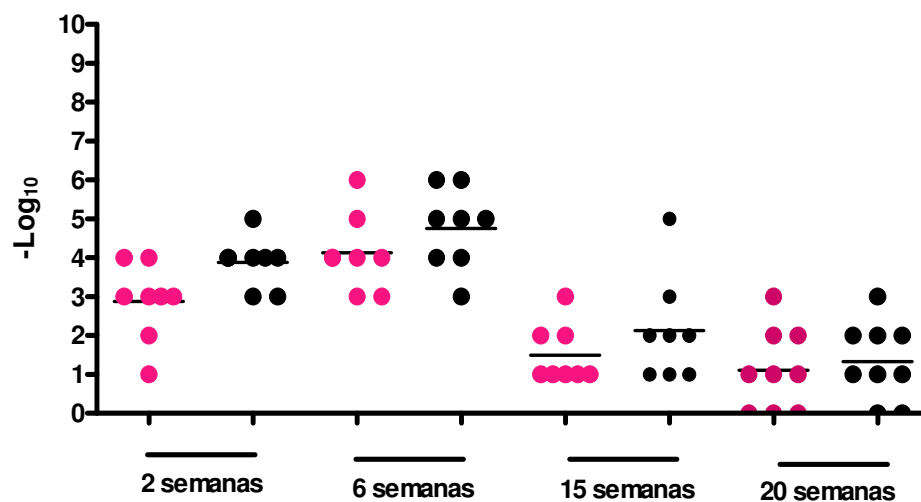


Figura 2: Parasitismo de camundongos C57BL/6 e TNFRp55^{-/-} infectados por *L. major*.

Os camundongos foram infectados com 1×10^6 de formas estacionárias de *L. major* em ambas as patas. As patas foram removidas para determinação da carga parasitária por meio da técnica de diluição limitante. A quantificação de parasitos foi determinada individualmente e as médias das diluições máximas de cada grupo foram expressas pelo logaritmo negativo do título (última diluição positiva). Barras representam a média \pm SD de. * representa $p < 0,05$ referente ao teste *t* de Student.

Os dados de parasitismo mostram que, na vigésima semana de infecção há uma redução drástica no número de parasitos do animal TNFRp55^{-/-}, assim como no camundongo C57BL/6, entretanto, neste mesmo período, no animal deficiente para o receptor 1 de TNF a lesão persiste. Em 1996, Vieira et al., mostraram que o baixo parasitismo no local de lesão em camundongos TNFRp55^{-/-}, juntamente com a lesão não cicatrizante, pode ser correlacionado com alguns dados em humanos acometidos pela forma muco-cutânea, nos quais as lesões também são crônicas e o parasitismo no local de lesão é relativamente baixo (Amato et al. 2003; 2008). Outros experimentos foram realizados infectando a diretamente as mucosas dos animais para avaliar o acometimento dessa região. Os resultados não mostraram desenvolvimento de lesões nessas regiões (dados não mostrados).

De acordo com a quantificação de parasitas, o motivo da persistência da lesão não seria devido ao parasitismo, uma vez que este já foi reduzido no TNFRp55^{-/-} de maneira

semelhante ao camundongo resistente. Tornou-se necessário, então, caracterizar o perfil citológico das lesões dos camundongos em questão.

Procedeu-se, assim, a realização da avaliação histopatológica das lesões em camundongos selvagens e nocautes infectados por *L. major*. A escolha dos períodos analisados foi determinada pelo perfil apresentado em cada uma das linhagens (figura 1). Duas semanas após o inóculo, a lesão na pata ainda é pequena, similar ao perfil bem caracterizado da infecção deste parasito em C57BL/6. Após seis semanas de infecção, enquanto nestes animais a lesão já está prestes a reduzir, os camundongos TNFRP55^{-/-} mostram uma lesão mais evidente. Quinze semanas após o inóculo, os camundongos de fenótipo selvagem já não mais apresentam lesão, ao passo que os TNFRP55^{-/-} possuem patas bem inflamadas, com lesões evidentes e que permanecem em torno de 1,5 – 2,0 mm até a vigésima semana. Sabendo-se disso, animais de ambas as linhagens, infectados (4 animais por grupo), foram sacrificados e o local de lesão foi coletado. Após a coleta as amostras foram embebidas em formol 10% usando volume suficiente para cobrir a amostra. Para confecção das lâminas, corou-se os cortes dos tecidos com HE (Hematoxilina- Eosina) e os processos inflamatórios foram analisados. **(Figura 4)**

Nossos resultados mostram que a observação histopatológica corrobora as medidas macroscópicas obtidas através do paquímetro e expressas na curva da figura 1. A análise dos cortes histológicos indica nos animais C57BL/6 uma clara tendência a resolver o processo inflamatório, com regeneração e restituição da integridade, aspecto que se torna muito evidente a partir da 15^a semana e se confirma na 20^a semana. Nos tempos anteriores, (2 e 6 semanas) esta diferença é menos perceptível à análise histopatológica, embora o tipo de infiltrado inflamatório e a sua densidade por área de tecido subcutâneo seja maior nos animais TNFRp55^{-/-}. O tipo de infiltrado mostra nestes camundongos uma variedade maior de tipos celulares, alguns com amplo citoplasma vacuolizado, e núcleo vesiculoso. Há também eosinófilos esparsos. Nos animais WT além da menor densidade, observa-se maior homogeneidade nos tipos celulares que tem citoplasma pequeno, compacto e núcleos intensamente basófilos e compactos. O edema intracelular é presente em ambos os grupos, mas no selvagem observa-se maior espaçamento entre os elementos teciduais, ocupado por edema, por vezes discretamente eosinofílico.

C57BL/6

TNFRp55^{-/-}

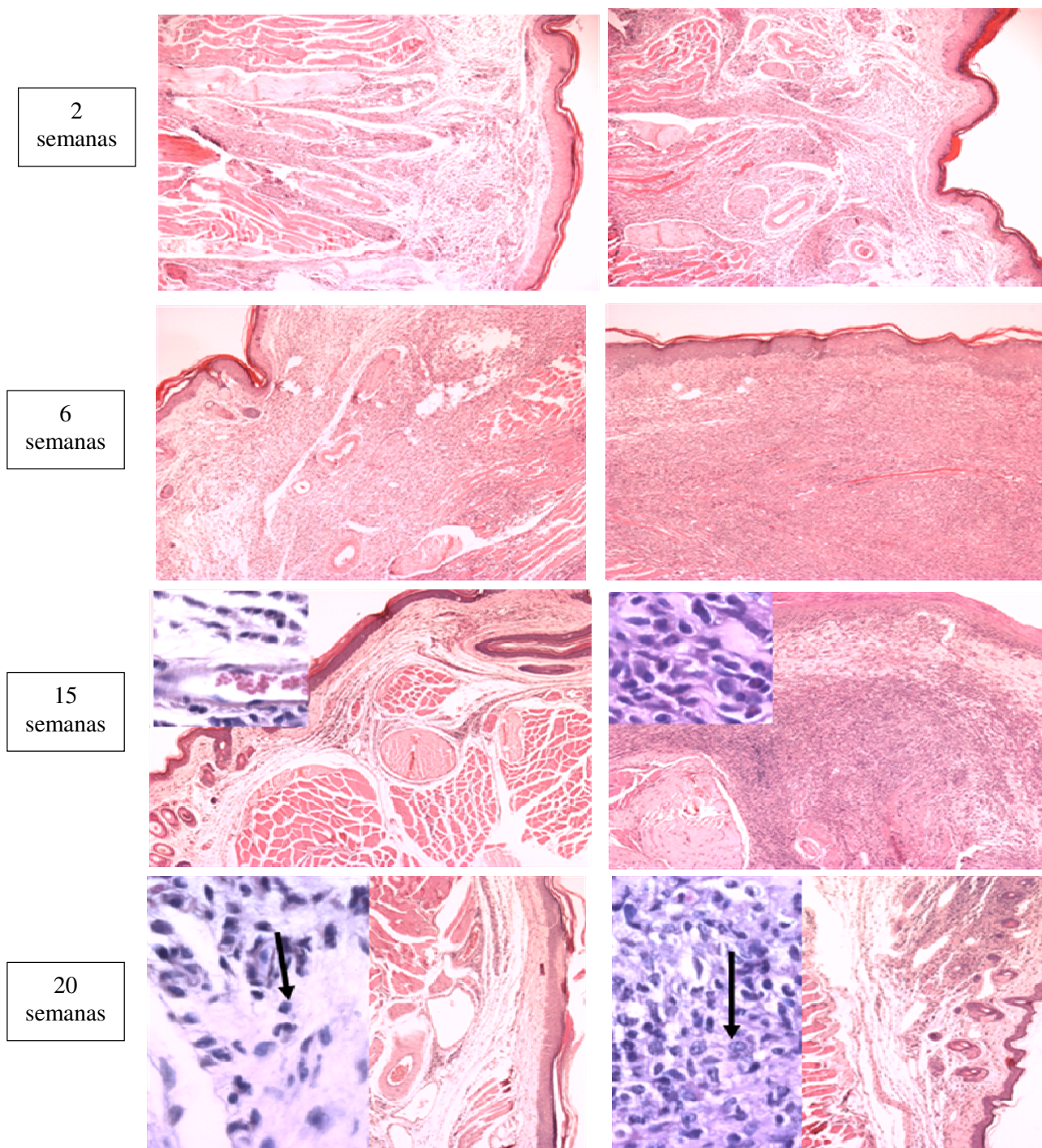


Figura 4: Fotomicrografias do local de lesão de camundongos C57BL/6 e TNFRp55^{-/-}. Figura 4: Fotomicrografias do local de lesão de camundongos C57BL/6 e TNFRp55^{-/-}. Os camundongos foram infectados com 1×10^6 de formas estacionárias de *L. major* na pata e sacrificados após 2, 6, 15 e 20 semanas de infecção. As patas foram removidas e as lesões coletadas para a análise histológica. As fotos mostram o perfil celular nas patas após a infecção.

No intuito de caracterizar as células inflamatórias que povoam em grande número a lesão do camundongo TNFRp55^{-/-}, procedeu-se à citometria de fluxo (**Figura 5**). Altas porcentagens de linfócitos T CD8⁺ foram encontradas nas patas destes animais no período crônico de infecção (15 semanas), juntamente com baixas porcentagens de macrófagos F4/80 positivos (**Figura 5a**), enquanto que uma alta porcentagem de células Ly6G positivas foram

detectadas neste local (**Figura 5a**). Além disso, a marcação Ly6G estava mais intensa nas células no animal TNFRp55^{-/-} (**Figura 5a histograma**). Em números absolutos, nós encontramos quantidades similares de células CD4⁺ e F4/80⁺ em ambos os grupos de camundongos (**Figuras 5b e 5d**). Mas, um maior número absoluto de células CD8⁺ e Ly6G⁺ foi detectado nas lesões do camundongo deficiente para o receptor P55 de TNF.

É bem descrito no perfil inflamatório de pacientes acometidos por leishmaniose mucocutânea o papel na exacerbação da injúria por células CD8⁺ (Barral-netto, 1995), similarmente ao que foi demonstrado no nosso modelo. Além disso, a presença de neutrófilos tem sido associada com altos níveis de IL-17 em áreas inflamadas nos pacientes infectados com *L. braziliensis* que desenvolveram leishmaniose mucocutânea (Boaventura et. al, 2010). Sendo assim, resolvemos investigar a transcrição desta citocina no período crônico de infecção (**Figura 6**). A alta dosagem de mRNA de IL-17 no nosso modelo coincide com o aumento de células Ly6G⁺ no local de lesão, na décima quinta semana de infecção. Sendo esta uma citocina pró-inflamatória, é cabível propormos uma relação entre os neutrófilos que povoam a região e a exacerbação da lesão.

Com relação às porcentagens de células F4/80⁺, acredita-se que o índice baixo desses fenótipos na lesão se deve ao fato de o local já estar ocupado por outros tipos celulares (como por exemplo, neutrófilos), o que possibilita que a baixa porcentagem de macrófagos no local de lesão não comprometa a resolução do parasitismo pelo animal TNFRp55^{-/-}.

Dados de apoptose *in situ* do nosso grupo revelam que, até 6 semanas após o inóculo, ambas as linhagens de camundongos demonstraram níveis similares de células apoptóticas na lesão, o que não ocorreu após 11 semanas, quando o animal selvagem já resolveu a inflamação, mas o camundongo nocaute ainda possui um vasto infiltrado inflamatório na pata (figura 1). O que se observou nesses experimentos, foi que o camundongo C57BL/6, na décima primeira semana de infecção possui significativamente mais células apoptóticas que o animal TNFRp55^{-/-} (dados não mostrados), o que sugere a importância do receptor P55 de TNF na resolução da inflamação e corrobora os dados acima, que mostram a persistência de células Ly6G⁺ e CD8⁺ na fase crônica, as quais contribuem para a manutenção do infiltrado inflamatório, mesmo após a resolução do parasitismo.

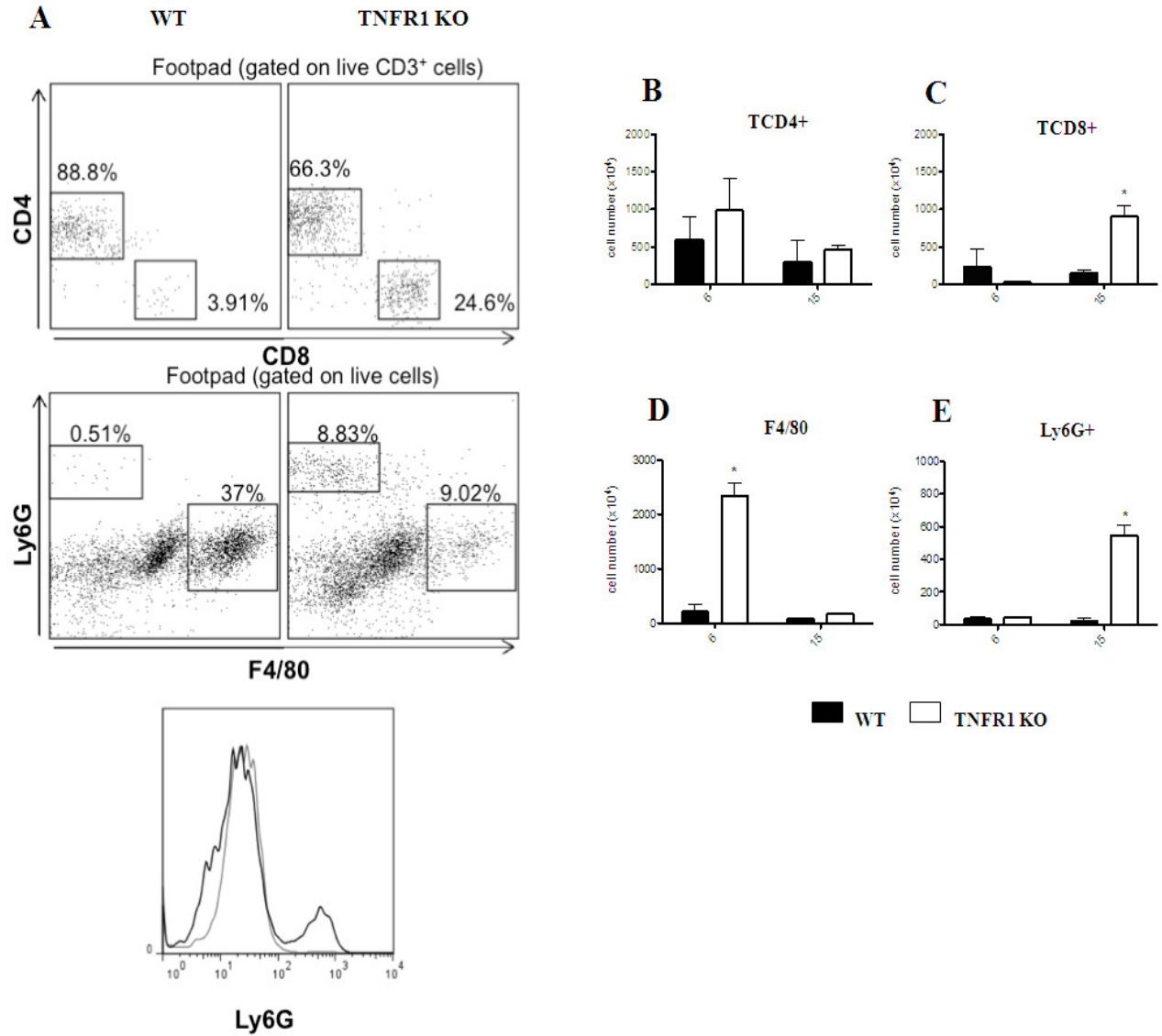


Figura 5: Citometria de fluxo das células inflamatórias no local de lesão de camundongos C57BL/6 e TNFRp55^{-/-}. Os camundongos foram infectados com 1×10^6 formas estacionárias de *L. major* na pata e sacrificados após 15 semanas de infecção. As patas foram removidas e as lesões maceradas e marcadas com anti- CD4 FITC, CD3 PE, CD8 PercP, F4/80 ou Ly6G FITC. **A**, porcentagem de células CD3⁺ que são também CD4⁺ ou CD8⁺; porcentagem de células Ly6G⁺ e porcentagem de células f4/80⁺. **B**, número absoluto de células marcadas na lesão.

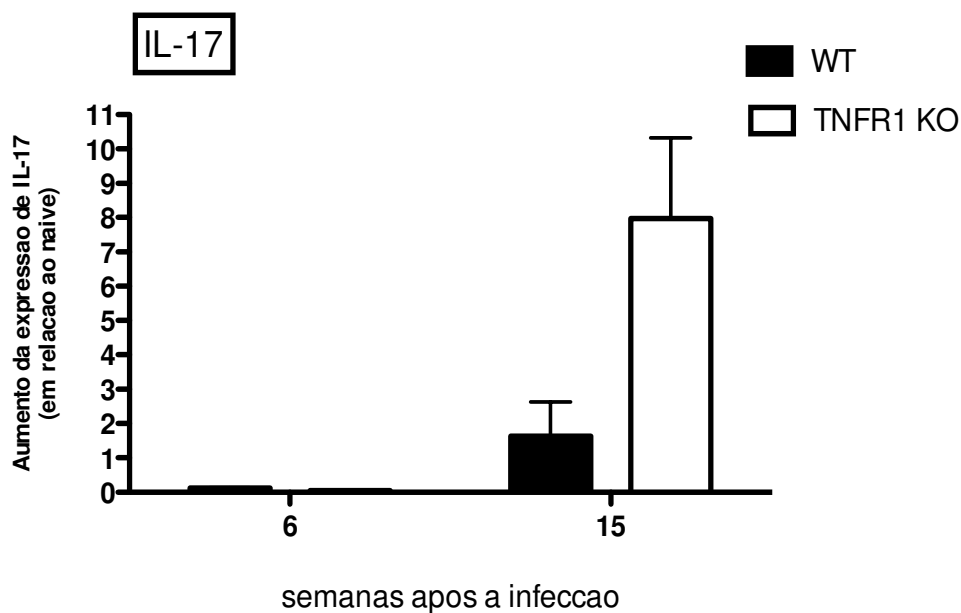


Figura 6: Real-time PCR para quantificação dos transcritos de IL-17 das células inflamatórias do local de lesão. Os camundongos foram infectados com 1×10^6 formas estacionárias de *L. major* na pata e sacrificados após 6 e 15 semanas de infecção as patas foram removidas, maceradas e o mRNA extraído com Trizol. Após a dosagem, foi convertido em cDNA e a PCR em tempo real foi realizado. Na sexta semana de infecção, níveis similares de transcritos IL-17, mas na 15ª semana o animal TNFRp55^{-/-} possui aumento da expressão dessa citocina em relação ao camundongo C57BL/6.

A partir dos dados que indicam maior número de células no sítio de infecção do animal TNFRp55^{-/-}, foi investigada pelo nosso laboratório a expressão de quimiocinas CCL2 e CCL5 por RT-PCR e ELISA, uma vez que o recrutamento de células para o local de lesão ou para tecidos danificados é promovido por meio da liberação dessas moléculas por células inflamadas. Nos momentos iniciais da infecção, dados do nosso grupo mostram os níveis destas quimiocinas similares em ambos os grupos, o que está de acordo com nossas observações histológicas que sugerem que o receptor 1 de TNF pode não ser fundamental para um recrutamento celular nesta fase da infecção. Tal observação também concorda com dados publicados em um modelo de angiogênese (Allavena ET. AL, 1994).

Entretanto, 11 semanas após a infecção, quando as lesões estão visivelmente diferentes, foram detectados altos níveis de mRNA e proteínas de CCL2 nas lesões no camundongo TNFRp55^{-/-}. Sabe-se que CCL2 é responsável por promover o recrutamento de macrófagos, monócitos, células T e NK para as lesões causadas por *Leishmania sp.* (Ritter e Moll, 2000), por isto, acreditamos que a exacerbação das lesões neste camundongo está relacionada aos altos níveis detectados destas quimiocinas (dados não mostrados).

Até o presente momento, observamos dados que mostram que camundongos TNFRp55^{-/-}, quando infectados com *L. major*, desenvolvem lesões crônicas persistentes, com baixo parasitismo local e com infiltrado inflamatório intenso, quando comparados aos animais C57BL/6.

Como perspectivas desse estudo, outras análises de citocinas (IFN- γ and TNF- α) por ELISA e apoptose destes pontos da infecção de animais selvagens e TNFRp55^{-/-} serão realizados para avaliar a influência do infiltrado de células no local de lesão.

À 15 de julho de 2011, após submissão do trabalho “Characterization of chronic cutaneous lesions from TNF receptor 1 deficient mice infected by *Leishmania major*” recebemos o aceite da revista Clinical and Developmental Immunology e aguardamos para a publicação.

Referências bibliográficas

- Acestor, N., Masina, S., Ives, A., Walker, J., Saravia, N. G., & Fasel, N. 2006, "Resistance to oxidative stress is associated with metastasis in mucocutaneous leishmaniasis", *J.Infect.Dis.*, vol. 194, no. 8, pp. 1160-1167.
- Afonso, L. C. & Scott, P. 1993a, "Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*", *Infect.Immun.*, vol. 61, no. 7, pp. 2952-2959.
- Afonso, L. C. C. & Scott, P. 1993b, "Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*", *Infect.Immun.*, vol. 61, pp. 2952-2959.
- Amato, V. S., de Andrade, H. F., & Duarte, M. I. 2003, "Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment", *Acta Trop.*, vol. 85, no. 1, pp. 39-49.
- Amato, V. S., Tuon, F. F., Bacha, H. A., Neto, V. A., & Nicodemo, A. C. 2008, "Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment", *Acta Trop.*, vol. 105, no. 1, pp. 1-9.
- Barral-Netto, M., et al., *Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis*. Parasite Immunol, 1995. **17**(1): p. 21-8.
- Barral, A., Barral-Netto, M., Yong, E. C., Brownell, C. E., Twardzik, D. R., & Reed, S. G. 1993, "Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 90, no. 8, pp. 3442-3446.
- Boaventura, V.S., et al., *Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines*. Eur J Immunol, 2010. **40**(10): p. 2830-6.
- Castes, M., Trujillo, D., Rojas, M. E., Fernandez, C. T., Araya, L., Cabrera, M., Blackwell, J., & Convit, J. 1993, "Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis", *Biol.Res.*, vol. 26, no. 1-2, pp. 233-238.
- Coffman, R. L., Varkila, K., Scott, P., & Chatelain, R. 1991, "Role of cytokines in the differentiation of CD4+ T-cell subsets in vivo", *Immunol.Rev.*, vol. 123, pp. 189-207.
- Da-Cruz, A. M., de Oliveira, M. P., De Luca, P. M., Mendonca, S. C., & Coutinho, S. G. 1996, "Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis", *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, vol. 91, no. 2, pp. 225-229.
- Desjeux, P. 2004, "Leishmaniasis", *Nat.Rev.Microbiol.*, vol. 2, no. 9, p. 692.
- Faria, D. R., Gollob, K. J., Barbosa, J., Jr., Schriefer, A., Machado, P. R., Lessa, H., Carvalho, L. P., Romano-Silva, M. A., de Jesus, A. R., Carvalho, E. M., & Dutra, W. O. 2005, "Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis", *Infect.Immun.*, vol. 73, no. 12, pp. 7853-7859.
- Herwaldt, B. L. 1999, "Leishmaniasis", *Lancet*, vol. 354, no. 9185, pp. 1191-1199.
- Kanaly, S. T., Nashleanas, M., Hondowicz, B., & Scott, P. 1999, "TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens", *J.Immunol.*, vol. 163, no. 7, pp. 3883-3889.
- Nashleanas, M., Kanaly, S., & Scott, P. 1998, "Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors", *J.Immunol.*, vol. 160, no. 11, pp. 5506-5513.
- Nashleanas, M. & Scott, P. 2000, "Activated T cells induce macrophages to produce NO and control *Leishmania major* in the absence of tumor necrosis factor receptor p55", *Infect.Immun.*, vol. 68, no. 3, pp. 1428-1434.

Oliveira, S. A., Souza, B. S., Guimaraes-Ferreira, C. A., Barreto, E. S., Souza, S. C., Freitas, L. A., Ribeiro-dos-Santos, R., & Soares, M. B. 2008, "Therapy with bone marrow cells reduces liver alterations in mice chronically infected by *Schistosoma mansoni*", *World J.Gastroenterol.*, vol. 14, no. 38, pp. 5842-5850.

Sacks, D. & Noben-Trauth, N. 2002, "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice", *Nat.Rev.Immunol.*, vol. 2, no. 11, pp. 845-858.

Silveira, F. T., Lainson, R., & Corbett, C. E. 2004, "Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review", *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, vol. 99, no. 3, pp. 239-251.

Späth, G. F. & Beverley, S. M. 2001, "A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective leishmania metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation", *Exp.Parasitol.*, vol. 99, no. 2, pp. 97-103.

Ritter, U. and H. Moll, *Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of leishmania major by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(11): p. 3111-20.

Vieira, L. Q., Goldschmidt, M., Nashleanas, M., Pfeffer, K., Mak, T., & Scott, P. 1996, "Mice lacking the TNF receptor p55 fail to resolve lesions caused by infection with *Leishmania major*, but control parasite replication", *J.Immunol.*, vol. 157, no. 2, pp. 827-835.

Zhao, Y. X., Lajoie, G., Zhang, H., Chiu, B., Payne, U., & Inman, R. D. 2000, "Tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice respond to acute *Yersinia enterocolitica* infection with less apoptosis and more effective host resistance", *Infect.Immun.*, vol. 68, no. 3, pp. 1243-1251.

1.10. Principais fatores negativos e positivos que interferiram na execução do projeto técnico-científico

Positivos:

O apoio e a amizade dos colegas de laboratório foram cruciais para o prosseguimento das atividades e dos experimentos até o momento.

A grande chance de aprender como fazer ciência de verdade, mesmo com recursos muitas vezes limitados.

A ótima orientação cuja conduta servirá de exemplo durante toda minha carreira.

A linha de pesquisa do laboratório, que nos permite ter contato com diversas técnicas, evitando que fiquemos restritos a somente um tipo de atividade e em apenas uma área.

Negativos:

Condições estruturais do ICB, que tem seu prédio invadido pela água durante o período de chuva, ou que eventualmente conta com a falta de luz, o que acontece quando estamos fazendo experimentos.

Data e assinatura do Bolsista

De acordo e assinatura do Orientador

PARTE 2

A ser elaborada pelo bolsista

1.11. Avaliação do Bolsista:

incluir uma avaliação crítica sobre o seu trabalho de Iniciação Científica, informando o possível impacto e os desdobramentos da Iniciação Científica na sua vida profissional.

As leishmanioses são doenças de grande impacto nos países tropicais e especialmente no estado de Minas Gerais e na cidade de Belo Horizonte, onde constituem uma endemia. O processo de cura é muito dificultado, portanto, trabalhar com uma proposta alternativa de resolução das lesões cutânea e mucocutânea por tratamento com células de medula óssea, torna-se uma experiência única e importante para o prosseguimento da minha vida acadêmico-científica. Os resultados tem se mostrado satisfatórios, os camundongos têm respondido bem ao tratamento e, se os experimentos continuarem nesse ritmo até a finalização do meu período de Iniciação Científica, a idéia é dar continuidade durante a futura Pós Graduação, a fim de desvendar quais seriam os mecanismos que envolvem o processo que estamos caracterizando e, por fim, podermos aplicá-lo a realidade vivenciada atualmente pelas pessoas acometidas pela doença.

1.12. Após concluir a Graduação, pretende (assinale):

- Ingressar na Pós-Graduação**
 Atuar no mercado de trabalho
 Não definiu ainda

Data e assinatura do Bolsista

PARTE 3

A ser elaborada pelo Orientador

2.1. Anexe um parecer sucinto sobre as atividades e o desempenho do bolsista

Como pode ser visto, os resultados obtidos pela bolsista são pertinentes e devem acrescentar ao projeto. A bolsista realizou os experimentos apresentados, sendo a pesquisadora principal (tem uma parte do projeto ao seu encargo). Creio que seus dados poderão constituir sua monografia e posteriormente sua dissertação de mestrado. A bolsista é responsável e realiza com cuidado seus experimentos. Além disto, apresenta domínio do assunto e espírito crítico, além de ser criativa. Teve um trabalho aceito para publicação como autora colaboradora. Estamos muito felizes com o desempenho da Paula.

2.2. O desempenho do bolsista pode ser considerado (assinale):

- X **Excelente** **Muito Bom** **Bom** **Regular** **Insatisfatório**

Data e assinatura do Orientador